

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotecnológica
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**“CARACTERIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE METABOLITOS DEL
CULTIVO DE *Bacillus.sp* EN FERMENTACIÓN *batch* CON CAPACIDAD
PROMOTORA DE CRECIMIENTO VEGETAL Y BIOCONTROL FRENTE
Rhizoctonia solani”**

Tesis presentada por la Bachiller:

Raa Del Carpio, Suzel Briana

Para optar el Título Profesional de:

Ingeniera Biotecnóloga

Asesor: Ing. Bardales Alvarez, Roxana

Co-Asesor: Dra. Zúñiga Dávila, Doris

Arequipa – Perú

2018

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20170000051058

N° Trámite en Fac. 368-2017

Fecha Recep. Fac. 14-11-2017

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: RAA DEL CARPIO, Suzel Briana

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"IDENTIFICACION Y CONSERVACION DE METABOLITOS DEL CULTIVO DE *Bacillus sp.* EN FERMENTACION BATCH CON CAPACIDAD PROMOTORA DE CRECIMIENTO VEGETAL Y BIOCONTROL FRENTE *Rhizoctonia solani*"

DICTAMINADORES: Dr. José Villanueva Salas 2) Mgter. Jaime Barreda del Carpio

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, según lo encargado, hemos procedido a revisar el Plan de Tesis intitulado: "IDENTIFICACION Y CONSERVACION DE METABOLITOS DEL CULTIVO DE *Bacillus sp.* EN FERMENTACION BATCH CON CAPACIDAD PROMOTORA DE CRECIMIENTO VEGETAL Y BIOCONTROL FRENTE A *Rhizoctonia solani*" y habiendo sido realizadas las correcciones y sugerencias correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMAS:

(Devolver antes de 8 días hábiles)

FECHA 06/12/17

ASESOR: Mgter. Roxana Bardales Álvarez

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

FIRMA

FECHA 24/04/18

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

1) Dr. José Villanueva Salas

3)

Mgter. Jaime Barreda del Carpio

2) Ing. Cinthia Córdova Barrios

DICTAMEN FINAL:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis sugiriendo se cambie el título a: "CARACTERIZACION Y CONSERVACION DE METABOLITOS DEL CULTIVO DE *Bacillus sp.* EN FERMENTACION batch CON CAPACIDAD PROMOTORA DE CRECIMIENTO VEGETAL Y BIOCONTROL FRENTE *Rhizoctonia solani*" y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, por lo que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA

(Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA

JURADOS: PRESIDENTE

VOCAL

SECRETARIO

Dr. José Villanueva Salas

Ing. Cinthia Córdova Barrios

Mgter. Jaime Barreda del Carpio

FECHA

20/09/18

HORA

19:00

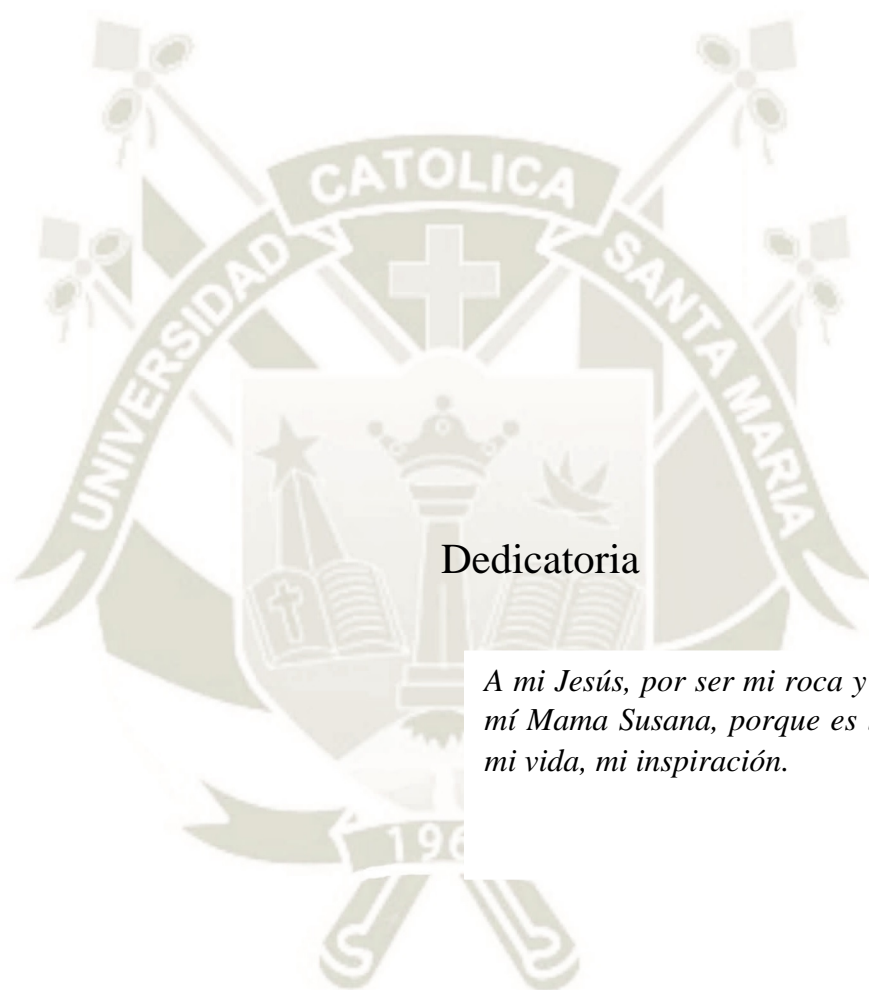
LOCAL

SVN C-402

FIRMA DEL DECANO

FECHA

11/09/18



Dedicatoria

*A mi Jesús, por ser mi roca y mi fortaleza, a
mí Mama Susana, porque es la luz que guía
mi vida, mi inspiración.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar conmigo en cada paso que doy, cuidándome y brindándome la fuerza para seguir adelante, por darme salud y todo en la vida permitiéndome llegar a todos mis objetivos.

A mis padres Susana Del Carpio y Carlos Raa por ser el pilar fundamental en mi vida sus consejos, amor, confianza y apoyo incondicional en todo momento, junto con mi familia y el mejor a mí costado Diego. P, Gracias a todos de corazón porque con ustedes lo logro todo, muy agradecida porque forman parte de mi vida.

A la Doc. Doris Zúñiga mi patrocinadora, que me permitió desarrollar esta investigación con su tutoría y confianza dándome la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A la Doc. Mirian Memensa por enseñarme y apoyarme durante todo este trabajo, gracias por sus valiosos consejos y afecto.

A todo el grupo de amigos del LMT que me alentaron y colaboraron para la realización de mi trabajo junto con sus conocimientos, trucos de laboratorio y linda amistad.

Por el financiamiento de mi proyecto de investigación al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú). Optimización del proceso de producción de metabolitos microbianos y su uso como herramienta de biocontrol de Fitopatógenos en el cultivo de frijol, de acuerdo al convenio 158-PNCP-PIAP-2015.

Laboratorio de Equipamiento Especializado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por el servicio, asesoría y uso de equipo y ambientes para el proceso de liofilizado en muestras.

Al programa de leguminosas de la UNALM por brindar la cantidad de semillas de frijol en alta calidad para un mejor desarrollo y respuestas del ensayo.

INTRODUCCION

Considerando la gran importancia que tiene para el ser humano la alimentación balanceada y los procesos que se requiere para el cultivo de estos productos que forman parte de la dieta diaria, los procesos naturales constituyen alternativas ecológicas y económicas para la sustitución parcial o total de fertilizantes químicos, se trabaja en función de utilizar los microorganismos con el objetivo de elevar las producciones de los cultivos agrícolas, como en nuestro país *Phaseolus vulgaris* (Frijol) que solo en el primer trimestre del 2017, nuestros granos peruanos, lograron los US\$11 millones en exportación. Los principales mercados destino fueron Estados Unidos, México, Chile y Canadá. Destacan también los países de Rusia, Italia, España y Líbano. Informo el ministerio de agricultura y riego (Minagri).(1) Junto con lo ya dicho, contrarrestar el impacto negativo sobre el medio ambiente, teniendo una base fundamental para la sostenibilidad y seguridad alimentaria en el planeta. En busca de encontrar soluciones, en los últimos años se han desarrollado estrategias alternativas para reemplazar los fertilizantes.(2)

Como alternativa al uso de agroquímicos se ha propuesto el uso de bacterias que tienen reconocida acción con actividad en promoción de crecimiento vegetal (PGP), por sus siglas en ingles. Estas bacterias son capaces de estimular el desarrollo de las plantas de manera directa e indirecta y poseen una serie de mecanismos complejos que interactúan entre sí para establecer relaciones benéficas con las raíces de las plantas. Existe una amplia gama de interrelaciones entre especies de microorganismos en los ecosistemas, tales como sinérgicas, antagónicas, de competencia física y bioquímica, moduladas por múltiples factores.(3)

Las bacterias Gram positivas formadoras de endosporas se agrupan en el género *Bacillus.sp* y otros géneros relacionados, recientemente separados taxonómicamente. Estos microorganismos se han estudiado desde hace muchos años debido a su importancia académica y ecológica y a los beneficios que brindan por medio de características como su endosporación con fines industriales y agrícolas.(4)

Las bacterias del género *Bacillus.sp* se encuentran ampliamente distribuidas en los más diversos hábitats que incluyen ecosistemas de suelo, de agua dulce y marinos, sus especies están muchas veces asociadas a plantas. En este último caso, se han demostrado las potencialidades de las especies del género *Bacillus.sp* para la producción de antibióticos, enzimas, fitohormonas, la solubilización de fosfatos (5) y la fijación biológica del nitrógeno.(6) En este sentido, se han realizado estudios de promoción del crecimiento vegetal (7) y control biológico de patógenos (8) buscando estrategias amigables que permitan la disminución del uso de fertilizantes químicos, que no solo desfavorecen la producción, sino también, traen consigo un impacto negativo sobre el medio ambiente. El estudio integral o en conjunto de estas características en bacterias como *Bacillus.sp* permitiría su posible utilización en conjunto en más de un beneficio proporcionando en la agricultura fundamentalmente, por lo que en el presente trabajo, se abordan los principales aspectos estudiados que brinda hasta el momento el género *Bacillus.sp*, así como sus potencialidades para ser utilizados en la Biotecnología Agrícola(9) en productos de importancia comercial por medio de los metabolitos ya mencionados.

Las fermentaciones industriales en denominación como "un proceso productivo que supone la utilización de células (microbianas) muy utilizadas para la producción de moléculas orgánicas". La mayoría de los productos obtenidos por fermentaciones microbianas son metabolitos secundarios.(10) Los metabolitos secundarios desempeñan diferentes papeles en la naturaleza, tales como antibióticos, toxinas, ionóforos, biorreguladores, así como, la señalización intra e interespecífica. Los que se producen por bacterias desde un punto de vista biotecnológico, los metabolitos bioactivos han sido generalmente estudiados como potenciales sustancias anti infecciosas (antibacterianos, anti fúngicos, antivirales y antiparasitarios).

Los compuestos producidos por microorganismos han hecho una extraordinaria contribución a la salud y al mejoramiento de la calidad de los seres vivos. Además de producir metabolitos primarios como aminoácidos y vitaminas, son capaces de

producir metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas, que constituyen hoy en día la mitad de los productos en el mercado.(11)

Los huéspedes de plantas también pueden verse afectados por hormonas conocidas por ser producidas por diversas especies microbianas, incluida *Bacillus.sp*, dichos compuestos (Ej: Auxinas, giberelinas y citoquininas) participan en procesos que incluyen la ampliación, división y agrandamiento de las células vegetales también en raíces simbióticas y raíces no simbióticas. Se ha informado que las cepas *Bacillus.sp* con acción en solubilización de fosfato aumentan sinérgicamente la acumulación de nitrógeno y fosfato de la planta.(12)

En el caso del género *Bacillus.sp*, se ha demostrado la producción de fitohormonas en la rizósfera de la planta. Por otra parte se ha informado la producción de este tipo de metabolitos en *Bacillus.sp* aislados de diferentes plantas, en la que ejerce un efecto positivo sobre el crecimiento vegetal. En laboratorios de otros autores, se ha demostrado la capacidad de cepas de *Bacillus.sp* asociadas al cultivos para producir auxinas, mediante el método colorimétrico de Salkowsky.(13)

El estudio de microorganismos promotores del crecimiento vegetal representa una opción para el manejo sostenible de agro sistemas. Es así como se hace interesante estudiar tipos de fermentación para la obtención de metabolitos secundarios, por lo que se ha reportado para bacterias en fermentación líquida son capaces de producir concentraciones considerables del compuesto durante la ideofase; es decir cuando ya ha finalizado su etapa de crecimiento.(14)

Por otro lado, en el campo de control tenemos la problemática de un patógeno de importancia como *Rhizoctonia solani* un hongo que bajo su prevalente presencia y la severidad con la que ataca los cultivos, resultan en pérdidas económicas considerables, rendimientos bajos e insuficientes ingresos para los productores, disminuyendo la producción en forma significativa de frijoles enteros.(15)

Es posible disminuir el nivel de esos organismos antagonistas, *Bacillus.sp* tiene propiedades particularmente deseables por sus características morfológicas y

fisiológicas para la supresión efectiva de patógenos radiculares provenientes del suelo por medio de antibiosis y competencia, la utilidad y desarrollo de estos organismos para el control de fito patógenos requiere de una serie de estudios lógicos, bien documentados para entender su conducta biológica y ecológica y estudios finales para su manejo adecuado.(16) Se ha observado los éxitos alcanzados en algunos países tropicales Brasil, Cuba, Perú, India, Filipinas entre otros con la utilización de los biofertilizantes, ha permitido su extensa aplicación en diferentes cultivos de interés como la caña de azúcar, trigo, arroz, tomate, algodón entre otros con la reducción hasta del 50% de los fertilizantes nitrogenados y fosfóricos convencionales con un incremento en los rendimientos entre el 15-30%.(17) (18)

A partir de la presencia de este tipo de plagas y las bajas tecnologías frente este es que se desencadena el uso excesivo de químicos que a corto y largo plazo son la apertura a problemas ambientales generando deterioros en la salud ya sea de consumidores e incluso los mismos agricultores con surgimiento de enfermedades respiratorias, alérgicas, reacciones en la piel y musculares, de igual forma los efectos en los microorganismos podrían ser contradictorios causando resistencias frente este tipo de productos siendo más difícil y peligrosa su atenuación.

Para casos como estos, debemos buscar alternativas con capacidades potenciales de promoción de crecimiento y control biológico proporcionando actividad anti fúngicas como son las cepas de bacterias de *Bacillus.sp* presentes en el suelo formando parte de la rizósfera del cultivo de frijol, esta nos proporciona metabolitos secundarios con características de biocontrol de plagas que no solo se podría encontrar este beneficio frente a huéspedes sino también efectos favorables para la planta en su desarrollo.

Los productos biológicos pueden ejercer una protección efectiva de las plántulas, siendo una herramienta importante en aquellos lugares donde el uso excesivo de químicos ha creado resistencia de los organismos patógenos. Por lo anterior los polipéptidos producidos por *Bacillus.sp* son sustancias naturales y por lo tanto biodegradables sin tener efectos residuales o contaminantes en los cultivos como nos dice Khem y Samsber.(19)

El centro internacional de agricultura Tropical (CIAT) (20) nos muestra las principales enfermedades del frijol en diferentes regiones productoras entre ellas en nuestra región incluye a Camaná con presencia de pudrición radical (PR). Por estas razones, en el presente trabajo se propuso el objetivo de este estudio fue el identificar metabolitos del cultivo de *Bacillus.sp* en fermentación tipo *batch* en Biorreactor con capacidad promotora de crecimiento vegetal a nivel *in vitro* e invernadero y biocontrol frente *Rhizoctonia solani* diferenciando su preservación a diferentes temperaturas de conservación.





RESUMEN

El tremendo daño ambiental y agrícola causado por la invasión patógena catalogada como un severo problema en todo el mundo, da inicio a acontecimientos como la revolución verde, la cual busca la optimización de nuevas tecnologías, como es el uso de microorganismos del género *Bacillus.sp* que ha sido determinado como uno de los géneros de gran importancia agraria, en este estudio se demuestra su actividad en el campo de investigación como alternativa de desarrollo bio-agroindustrial por su capacidad de sintetizar compuestos que muestran beneficios frente a un mejor desarrollo de cultivos, y mitigar la fuerte incidencia de otros microorganismos patógenos.

La cepa de *Bacillus.sp* aislada de la rizósfera de frijol fue inoculada en un Biorreactor en sistema *batch*, con contenido de un medio mínimo mineral en el que la bacteria da inicio a su proceso de endosporación, de este proceso se identifica la presencia de metabolitos que actúen como promotores de crecimiento vegetal (PGP) y biocontrol contra *Rhizoctonia solani*.

Se obtuvieron metabolitos que intervienen con acción PGP, el ácido indol acético (AIA) que alcanza una concentración total de 38.572 ug/mL a las 72 horas de evaluación, para la actividad de solubilización de fosfatos es positivo por la presencia

de halo en el medio de cultivo, mientras que en los ensayos de presencia de sideróforos resulto negativo.

En el proceso de evaluación de germinación de semillas a nivel *in vitro* del efecto del fermentado de la cepa de *Bacillus.sp* en cultivos como el frijol y en otras semillas (brócoli, rabanito, tomate y lechuga), dando un amplio campo de acción, fue favorable para la respuesta en el inóculo del sobrenadante y del fermentado presentaron buena elongación de hipocótilo, porcentaje de germinación, mayor cantidad de pelos radiculares en los brotes en comparación con el control positivo el *Rhizobium* E-10.

Para el efecto de biocontrol frente a *Rhizoctonia solani*, la presencia de enzimas fue positivo para celulasas, amilasas y proteasas, y negativo para la presencia de quitinasas. La evaluación *in vitro* para inhibición del hongo en placa por la acción de los inóculos resulto con la formación de halos crecientes con relación al tiempo.

En el caso del frijol se evaluó su desarrollo a nivel de invernadero con inóculos de tratamiento sometidos a diferentes temperaturas de conservación por enfriamiento de -20°C, 4°C, Temperatura ambiente y finalmente liofilizado, evaluando así esta forma de conservación después del periodo de vida por un mes en anaquel que permitan conservar sus propiedades. Se registró una mayor actividad de respuesta con respecto a la acción del sobrenadante y fermentado a temperaturas a -20°C y liofilizado como PGP logro dar mejor aspecto a la planta un mejor color, tamaño, número de nódulo, área foliar y radicular por sobre los demás de igual forma para la resistencia del hongo fueron los mismos inóculos con los se vio menos la incidencia de infección del hongo en cultivos.

Palabras clave: *Bacillus.sp*, Metabolitos, PGP, Biocontrol, *Rhizoctonia solani*, frijol

ABSTRACT

The tremendous environmental and agricultural damage caused by the pathogen invasion cataloged as a severe problem throughout the world, gives rise to events such as the green revolution, which seeks the optimization of new technologies, such as the use of microorganisms of the *Bacillus* genus which has been determined as one of the genus of great agrarian importance, this study demonstrates its activity in the field of research as an alternative to bio-agroindustrial development for its ability to synthesize compounds that show benefits in the face of better crop development, and mitigate the strong incidence of other pathogenic microorganisms.

The *Bacillus.sp* strain isolated from the bean rhizosphere was inoculated in a bioreactor in batch system, with a minimum mineral content in which the bacterium starts its endospore formation process, this process identifies the presence of metabolites that act as promoters of plant growth (PGP) and biocontrol against *Rhizoctonia solani*.

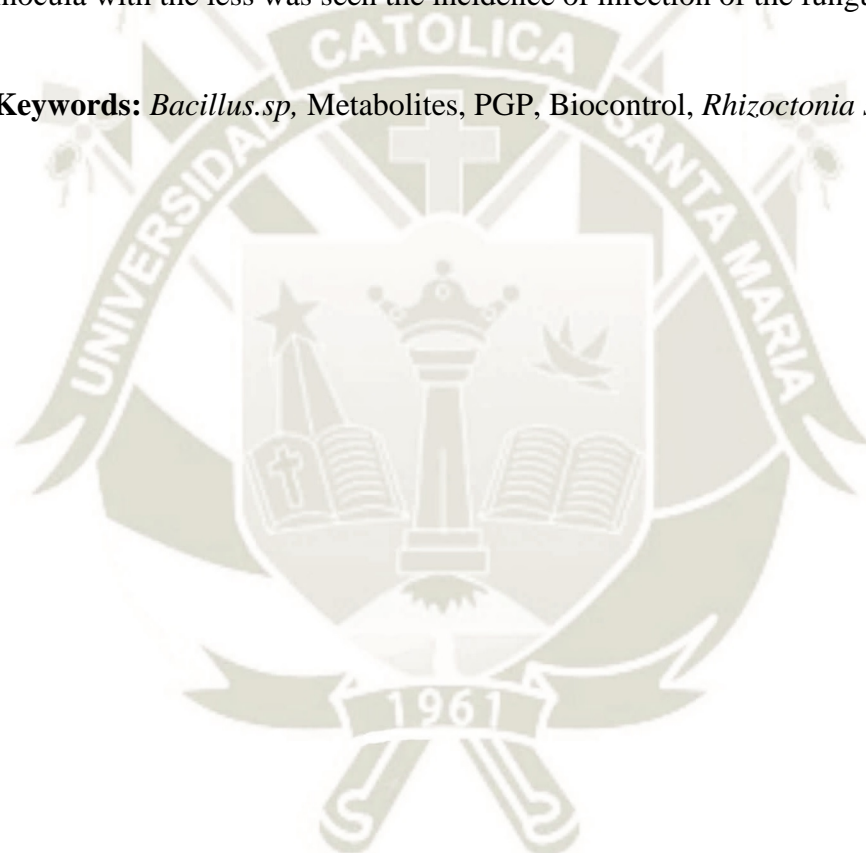
Metabolites involved with PGP action were obtained, indole acetic acid (IAA) that reached a total concentration of 38,572 ug / mL after 72 hours of evaluation, for the activity of solubilization of phosphates is positive by the presence of halo in the medium of culture, whereas in the presence tests of siderophores it was negative.

In the process of germination evaluation of seeds at in vitro level of the effect of the fermentation of the strain of *Bacillus.sp* in crops such as beans and other seeds (broccoli, radish, tomato and lettuce), giving a wide field of action, was favorable for the response in the inoculum of the supernatant and the fermented showed good elongation of hypocotyl, percentage of germination, greater amount of root hairs in the shoots compared to the positive control *Rhizobium* E-10.

For the effect of biocontrol against *Rhizoctonia solani*, the presence of enzymes was positive for cellulases, amylases and proteases, and negative for the presence of chitinases. The in vitro evaluation for inhibition of the fungus in plaque by the action of inocula resulted in the formation of increasing halos in relation to time.

In the case of beans, their development at the greenhouse level was evaluated with treatment inocula subjected to different storage temperatures by cooling at -20°C , 4°C , room temperature and finally lyophilized, thus evaluating this form of conservation after the period of life for a month on a shelf that allows them to preserve their properties. A greater response activity was registered with respect to the action of the supernatant and fermented at temperatures at -20°C and lyophilized as PGP achieved better appearance to the plant a better color, size, number of nodule, leaf area and root over the others in the same way for the resistance of the fungus were the same inocula with the less was seen the incidence of infection of the fungus in crops.

Keywords: *Bacillus.sp*, Metabolites, PGP, Biocontrol, *Rhizoctonia solani*, Bean



INDICE GENERAL

INTRODUCCION	1
RESUMEN	1
ABSTRACT	1
HIPOTESIS	1
OBJETIVOS	1
General	
Específicos	
CAPITULO I: MARCO TEORICO	1
1.1.Metabolitos en bacterias.	1
1.2.Biología de <i>Bacillus.sp.</i>	2
1.2.1. <i>Bacillus.sp</i> como productor de Metabolitos.	3
1.2.2. Rol de los metabolitos secundarios.	4
1.2.3. Endosporación de <i>Bacillus.sp.</i>	5
1.2.4. Aplicación Biotecnológica.	6
1.3. Promoción de crecimiento Vegetal (PGP).	7
1.3.1. Microorganismos y Solubilización de Fosfatos.	8
1.3.2. Producción de Acido Indol Acético.	10
1.3.2.1.Acido Indol Acético en germinación de semillas.	11
1.3.3. Sideróforos como PGP.	11
1.4.Antagonismo Microbiano.	12
1.5.Enzimas líticas.	13
1.5.1. Actividad Amilolítica	14
1.5.2. Actividad Celulolítica	15
1.5.3. Actividad Proteolítica	16
1.5.4. Actividad Quitinolítica	16
1.6. Biología de <i>Rhizoctonia solani</i>	17
1.6.1. Diseminación de <i>Rhizoctonia solani</i>	18
1.6.2. Infección	18
1.6.3. Síntomas	19

1.7. Cultivo Tipo <i>Batch</i>	19
1.8. Temperaturas de conservación	20
1.9. Conservación por liofilizado	21
1.10 Cultivos con Importancia	22
1.10.1. <i>Phaseolus vulgaris</i> (Frijol)	23
1.10.2. <i>Brassica oleracea</i> (Brócoli)	24
1.10.3. <i>Lycopersicum esculentum</i> (Tomate)	24
1.10.4. <i>Lactuca sativa</i> (Lechuga)	25
1.10.5. <i>Raphanus sativus</i> (Rabanito)	26
CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS	28
2.1. MATERIALES	29
2.1.1. Muestras y/o unidades biológicas	29
2.1.2. Material de laboratorio	29
2.1.3. Insumos y reactivos químicos	29
2.1.4. Equipos e instrumentación	30
2.1.5. Otros	30
2.1.6. Lugar de ejecución	31
2.2. METODOLOGIA	31
2.2.1. Presencia de metabolitos con actividad promotora de crecimiento vegetal a nivel <i>in vitro</i> y en semillas	31
2.2.1.1. Producción de metabolitos del cultivo de <i>Bacillus.sp</i> en fermentación Batch	31
2.2.1.1.1. Cultivo de <i>Bacillus.sp</i> a nivel de Biorreactor	31
2.2.1.1. Preparación de inóculo.	33
2.2.1.2. Prueba de presencia de Ácido indol acético	33
2.2.1.2.1. Curva patrón para Ácido indol acético	33
2.2.1.2.2. Determinación de concentración de Ácido indol acético	35
2.2.1.3. Prueba de Solubilización de fosfatos.	36
2.2.1.4. Prueba de presencia de Sideróforos.	36
2.2.1.5. Germinación de Semillas a nivel <i>in vitro</i>	37

2.2.1.5.1. Preparación de los productos metabólicos obtenidos a partir del cultivo de <i>Bacillus.sp</i> a nivel de Biorreactor.	37
2.2.1.5.2. Desinfestación de semillas.	38
2.2.1.5.3. Inoculación de semillas.	38
2.2.2. Determinar la presencia de enzimas hidrolíticas y metabolitos con actividad antifúngica a partir del cultivo de <i>Bacillus.sp</i> en fermentación batch a nivel de Biorreactor.	40
2.2.2.1. Prueba de Presencia de Celulasas.	40
2.2.2.2. Prueba de presencia de Proteasas.	41
2.2.2.3. Prueba de presencia de Amilasas.	41
2.2.2.4. Prueba de presencia de Quitinasas.	41
2.2.2.4.1. Preparación Agar Quitina Coloidal	41
2.2.2.4.2. Pretratamiento de quitina coloidal (QC)	42
2.2.2.5. Prueba de cuantificación de Proteínas totales.	42
2.2.2.5.1. Curva patrón de Albumina.....	42
2.2.3.6. Actividad Antagonista de Biocontrol.....	44
2.2.3.6.1. Microorganismo.....	44
2.2.3.6.2. Bioensayo	44
2.2.3. Efecto de la actividad de metabolitos en conservación con promotores de crecimiento vegetal y acción antifúngica a nivel de invernadero	45
2.2.3.1. Preparación de los metabolitos con actividad antifúngica bajo diferentes métodos de conservación	45
2.2.3.2. Parámetros utilizados para el proceso de liofilizado	45
2.2.3.3. Germinación de semillas de frijol	46
2.2.3.4. Instalación del ensayo a nivel de tinglado.....	46
2.2.3.4.1. Preparación de sustrato en maceta.	46
2.2.3.4.2. Inoculación de semillas	46
2.2.3.4.3. Soporte para hongo patógeno <i>Rhizoctonia solani</i>	47
2.2.3.4.4. Diseño experimental.....	49
2.2.3.4.5. Medición y Evaluación de parámetros agronómicos	50
2.2.3.4.6. Evaluación de incidencia de la enfermedad	51

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION 52

3.1. Presencia de metabolitos con actividad promotora del crecimiento vegetal a nivel *in vitro* y en semillas de interés 52

3.1.1. Curva patrón de Acido indol acético 52

3.1.2. Detección colorimétrica de extractos obtenidos 53

3.1.3. Solubilización de fosfatos 56

3.1.3.1. Eficiencia de solubilización (SE)..... 57

3.1.4. Presencia de Sideróforos 59

3.1.5. Efecto metabólico en semillas de interés a nivel *in vitro*..... 62

3.1.5.1. Semillas de frijol 62

3.1.5.2. Semillas de Brócoli. 67

3.1.5.3. Semillas de Rabanito..... 70

3.1.5.4. Semillas de Lechuga. 73

3.1.5.5. Semillas de Tomate..... 76

3.2. Presencia de enzimas hidrolíticas con actividad antifúngica Contra *Rhizoctonia solani* 81

3.2.1. Detección de enzimas hidrolíticas extracelulares producidas 81

3.2.1.1. Presencia de Celulasas 81

3.2.1.2. Presencia de Amilasas. 83

3.2.1.3. Presencia de Proteasas. 85

3.2.1.4. Presencia de Quitinasas 87

3.2.2. Cuantificación de Proteínas totales 88

3.2.3. Actividad Antagonista *in vitro*. 92

3.3. Metabolitos en conservación con promotores del crecimiento Vegetal y antifúngica a nivel de invernadero 95

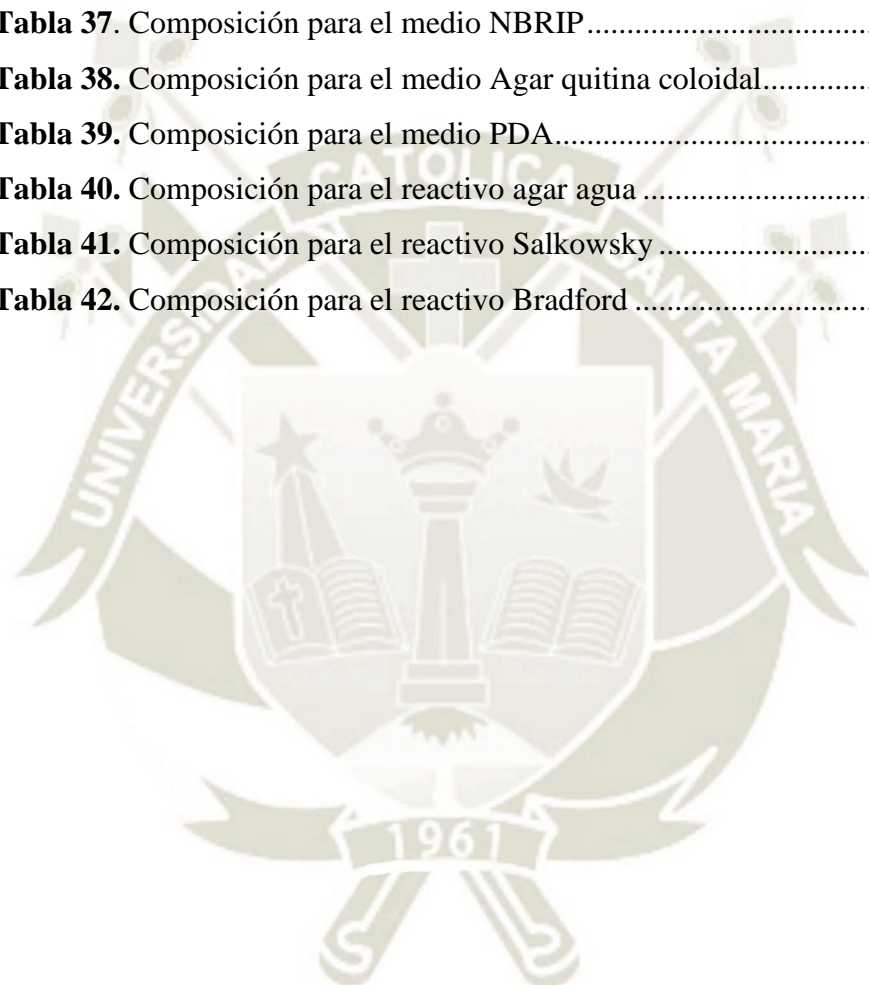
3.3.1. Parámetros Agronómicos e incidencia de la enfermedad	95
3.3.1.1. Evaluación de la Parte Aérea de la planta de frijol	95
3.3.1.2. Evaluación de la Parte Raíz de la planta de frijol	102
4. CONCLUSIONES	112
5. RECOMENDACIONES	114
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	115
7. ANEXOS	128
7.1. Anexo 1. Medios de cultivo	128
7.2. Anexo 2. Reactivos	136
7.3. Anexo 3. Definición de ligando	137
7.4. Anexo 4. Esquema de distribución de macetas de frijol a nivel invernadero ..	138
7.5. Anexo 5. Tabla de medidas de la evaluación de cada repetición de tratamiento de germinación <i>in vitro</i> de semillas de frijol.	141
7.6. Anexo 6. Tabla de medidas de la evaluación de cada repetición de tratamiento de germinación <i>in vitro</i> de semillas de brócoli.	145
7.7. Anexo 7. Tabla de medidas de la evaluación de cada repetición de tratamiento de germinación <i>in vitro</i> de semillas de Rabanito.	149
7.8. Anexo 8. Tabla de medidas de la evaluación de cada repetición de tratamiento de germinación <i>in vitro</i> de semillas de Lechuga.	153
7.9. Anexo 9. Tabla de medidas de la evaluación de cada repetición de tratamiento de germinación <i>in vitro</i> de semillas de Tomate.	157
7.10. Anexo 10. Tabla de medidas de evaluación de cada repetición de tratamiento en el área foliar de la planta de frijol a nivel invernadero	161
7.11. Anexo 11. Tabla de medidas de evaluación de cada repetición de tratamiento en el área de raíz de la planta de frijol a nivel invernadero	165

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formas de fosforo presentes en el suelo.	9
Tabla 2. Tiempo de germinación y temperaturas máximas, mínimas y óptimas para semillas de frijol, brócoli, Tomate, Lechuga, rabanito....	27
Tabla 3. Valores para la preparación de las concentraciones patrón de Acido indol acético.	34
Tabla 4. Condiciones recomendadas para la prueba de efecto metabólico de los extractos de la fermentación de <i>Bacillus.sp</i> en germinación de semillas in vitro...	38
Tabla 5. Valores para la preparación de las concentraciones patrón para la evaluación de proteínas totales.....	43
Tabla 6. Distribución de tratamientos para el ensayo en planta de frijol en invernadero	49
Tabla 7. Escala para evaluación de grado de severidad de ataque del hongo en la raíz del cultivo de frijol	51
Tabla 8. Absorbancias promedio de las muestras para generar la Curva patrón de Acido indol acético	52
Tabla 9. Absorbancia de 8 muestras de sobrenadante de diferentes tiempos de fermentación bacteriana de <i>Bacillus.sp</i>	54
Tabla 10. Resumen de resultados obtenidos en los análisis de propiedades para la acción PGP.....	61
Tabla 11. Resumen estadístico de la evaluación del efecto metabólico en el crecimiento de hipocótilo en semillas de frijol de 24 a 96 horas.	63
Tabla 12. Promedio de la incidencia del fermentado de <i>Bacillus.sp</i> como tratamientos en el porcentaje del estímulo en germinación de semillas de frijol a las 32 horas	65
Tabla 13. Comparación múltiple de incidencia de los tratamientos del fermentado de <i>Bacillus.sp</i> en el porcentaje de germinación de semillas de frijol a las 32 horas	66
Tabla 14. Resumen estadístico de la evaluación del efecto metabólico en el crecimiento de hipocótilo en semillas de brócoli de 24 a 96 horas de incubación. ...	67
Tabla 15. Promedio de incidencia de los tratamientos del fermentado de <i>Bacillus.sp</i> en el porcentaje de germinación de semillas de brócoli 32 horas	69

Tabla 16. Resumen estadístico de evaluación del efecto metabólico en el crecimiento del hipocótilo en semillas de rabanito de 24 a 96 horas de incubación.....	71
Tabla 17. Promedio incidencia de los tratamientos del fermentado de <i>Bacillus.sp</i> en el porcentaje de germinación de semillas de rabanito 32 horas.	73
Tabla 18. Resumen estadístico de evaluación del efecto metabólico en el crecimiento de hipocótilo en semillas de lechuga de 24 a 96 horas de incubación.....	74
Tabla 19. Promedio de la incidencia de los tratamientos del fermentado de <i>Bacillus.sp</i> en el porcentaje de germinación de semillas de lechuga a las 32horas	76
Tabla 20. Resumen estadístico de la evaluación del efecto metabólico en el crecimiento de hipocótilo en semillas de tomate de 24 a 96 horas de incubación.....	77
Tabla 21. Promedio de incidencia de los tratamientos en el porcentaje de germinación de semillas de tomate a 48 horas.	79
Tabla 22. Comparación de promedio de los pesos de semillas por tratamientos obtenidos al final de la evaluación.	79
Tabla 23. Tamaño de halo (mm) en la prueba <i>in vitro</i> mediante la prueba de CMC por la acción de 8 muestras de sobrenadante de diferentes tiempos de fermentación bacteriana de <i>Bacillus.sp</i>	82
Tabla 24. Tamaño de halo (mm) en la prueba <i>in vitro</i> con Agar almidón por la acción de 8 muestras de sobrenadante de diferentes tiempos de fermentación bacteriana de <i>Bacillus.sp</i>	84
Tabla 25. Tamaño de halo neto (mm) de la acción de 8 muestras de sobrenadante del fermentado bacteriano de <i>Bacillus.sp</i> de la prueba <i>in vitro</i> con Agar leche	86
Tabla 26. Absorbancias obtenidas de las muestras patrón para la para evaluación proteínas totales.....	88
Tabla 27. Absorbancias promedio para las lecturas de las muestras de fermentado.	90
Tabla 28. Resumen de resultados obtenidos en los análisis de enzimas hidrolíticas y antagonismo.	93
Tabla 29. Efecto metabólico a diferentes temperaturas de conservación.	98
Tabla 30. Efecto metabólico a diferentes temperaturas de conservación sobre la raíz de la planta de frijol	104
Tabla 31. Efecto metabólico a diferentes temperaturas de conservación sobre la raíz de la planta de frijol diferenciando la Presencia nodular e incidencia de la enfermedad del hongo.	108

Tabla 32. Comparación múltiple de incidencia de enfermedad causada por <i>Rhizoctonia solani</i>	109
Tabla 33. Composición para el medio TSB	127
Tabla 34. Composición para el medio TSA	128
Tabla 35. Composición para el medio LMC	129
Tabla 36. Composición para el medio LMA.....	130
Tabla 37. Composición para el medio NBRIP.....	130
Tabla 38. Composición para el medio Agar quitina coloidal.....	133
Tabla 39. Composición para el medio PDA.....	134
Tabla 40. Composición para el reactivo agar agua	134
Tabla 41. Composición para el reactivo Salkowsky	135
Tabla 42. Composición para el reactivo Bradford	135



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microfotografías electrónicas de barrido que muestran el efecto antagonista de ETR17 sobre <i>Rhizoctonia solani</i> ; La lisis de las hifas fúngicas está indicada por flechas	14
Figura 2. Tanque fermentado tipo <i>batch</i>	20
Figura 3. Presentación del microorganismo, A) Cepa de <i>Bacillus.sp</i> utilizada vista macroscópica B) cepa de <i>Bacillus.sp</i> vista microscópica	32
Figura 4. Equipo fermentador de laboratorio Automatizado (APPLIKON) con capacidad de 3 litros utilizado para la fermentación de la cepa.....	32
Figura 5. Espectrofotómetro utilizado para la cuantificación colorimétrica.....	35
Figura 6. Esquema general del procedimiento de la prueba de efecto metabólico en germinación para cada tipo de semillas y sus tratamientos.	39
Figura 7. Vista del sistema instalado en maceta, como soporte para la inoculación en planta de los tratamientos del fermentado bacteriano con actividad de PGP y como biocontrol	47
Figura 8. A) Infección del hongo <i>Rhizoctonia solani</i> en planta de frijol, B) pudrición en el cuello del tallo y raíz, C) corte longitudinal, apreciación de muerte del tejido, D) deterioro y pudrición del tallo de la planta.....	48
Figura 9. Curva de calibración del reactivo Salkowsky.....	54
Figura 10. Curva de producción de Acido indol acético.....	55
Figura 11. Evaluación de Acido indol acético en el sobrenadante del fermentado de <i>Bacillus.sp</i> por las tomas de muestreo durante las 72 horas	56
Figura 12. Evaluación de solubilización de fosfatos en medio NBRIP por el sobrenadante del fermentado de <i>Bacillus.sp</i>	57

Figura 13. Evaluación de la presencia de sideróforos, en el muestreo, realizado por 72 horas del fermentado de <i>Bacillus.sp</i> , en el medio de cultivo CAS-aminoácidos..	60
Figura 14. Respuestas biológicas expresadas en semillas de frijol, por tratamientos del fermentado de <i>Bacillus.sp</i> en placas con agar agua.	62
Figura 15. Promedios de evaluación del crecimiento de hipocótilo en semillas de frijol de cada tratamiento a las 72 horas de incubación	64
Figura 16. Respuestas biológicas expresadas en semillas de brócoli, por tratamientos del fermentado de <i>Bacillus.sp</i> en placas con agar agua	68
Figura 17. Promedios de evaluación del crecimiento de hipocótilo en semillas de brócoli de cada tratamiento a las 56 horas de incubación	69
Figura 18. Respuestas biológicas expresadas en semillas de rabanito por tratamientos del fermentado de <i>Bacillus.sp</i> , en placas con agar agua	70
Figura 19. Promedios de evaluación del crecimiento de hipocótilo en semillas de rabanito de cada tratamiento a las 56 horas de incubación.....	72
Figura 20. Respuestas biológicas expresadas en semillas de lechuga por tratamientos del fermentado de <i>Bacillus.sp</i> en placas con agar agua	74
Figura 21. Promedios de evaluación del crecimiento de hipocótilo en semillas de lechuga de cada tratamiento a las 56 horas de incubación	75
Figura 22. Respuestas biológicas en semillas de tomate por tratamientos del fermentado de <i>Bacillus.sp</i> en placas con agar agua	77
Figura 23. Promedios de evaluación del crecimiento de hipocótilo en semillas de tomate de cada tratamiento a las 56 horas de incubación	78
Figura 24. Actividad de hidrólisis de celulosa de las toma de muestras de 0 a 72 horas de sobrenadante del fermentado de la cepa <i>Bacillus.sp</i> , en placas con medio CMC.....	81
Figura 25. Actividad de hidrólisis de Amilasas de la toma de muestras de 0 a 72 horas de sobrenadante del fermentado de la cepa <i>Bacillus.sp</i> en placas con medio suplementado con almidón.....	83
Figura 26. Actividad proteolítica de la toma de muestras de 0 a 72 horas de sobrenadante del fermentado de la cepa <i>Bacillus.sp</i> en placas con medio proteico Agar leche.	85

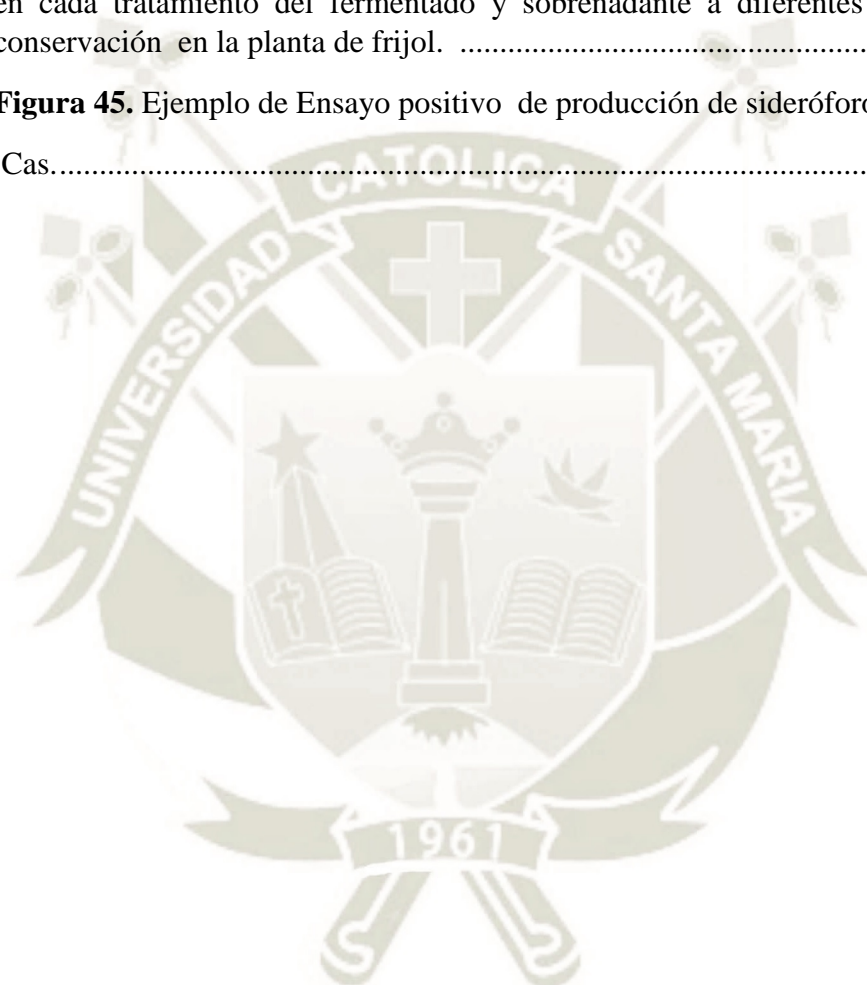
Figura 27. Actividad Quitinolítica de la toma de muestras de 0 a 72 horas del sobrenadante fermentado de la cepa <i>Bacillus.sp</i> En placas con medio Agar quitina coloidal, observándose negativo para halos alrededor de los pozo de siembra de cultivo	87
Figura 28. Curva patrón de calibración para proteínas totales con reactivo Bradford	89
Figura 29. Curva de presencia de proteínas totales.....	90
Figura 30. Evaluación de metabolitos del tipo proteico en las tomas de muestreo entre las 0 a las 72 horas de sobrenadante del fermentado de <i>Bacillus.sp</i>	91
Figura 31. Inhibición del crecimiento del hongo <i>Rhizoctonia solani</i> por efecto del sobrenadante compuesto de metabolitos presentes en el fermentado de <i>Bacillus.sp</i> . ..	92
Figura 32. (A) muestra el resultado 6.53 g de liofilizado de 250 mL de fermentado. (B) muestra el resultado de 6.26 g de liofilizado de 250 mL del sobrenadante obtenido.	95
Figura 33. Comparación de la parte aérea de plantas de frijol con efecto de PGP por los tratamientos en conservación del fermentado de <i>Bacillus.sp</i>	95
Figura 34. Comparación de la parte aérea de la plantas de frijol con efecto antagónico de los tratamientos en conservación frente al hongo <i>Rhizoctonia solani</i>	97
Figura 35. Comparación de los valores de altura de la parte aérea dela plata de frijol medios de 20 variables dependientes, obtenidos en el experimento inoculada con evaluacion para PGP y PGP + Patógeno.....	99
Figura 36. Comparación de los valores de peso fresco de la parte aérea dela plata de frijol obtenidos en los 20 tratamientos aplicados en el experimento con evaluación para PGP y PGP + Patógeno	100
Figura 37. Comparación de los valores de peso seco de la parte aérea de la plata de frijol obtenidos de los 20 tratamientos aplicados en el experimento con evaluación para PGP y PGP + Patógeno, frente a dos controles (E-10 y C. Químico).....	101
Figura 38. Raíz de plantas de frijol con efecto de PGP de los tratamientos.....	102
Figura 39. Raíz de plantas de frijol con efecto antagónico de los tratamientos frente el hongo <i>Rhizoctonia solani</i>	103
Figura 40. Análisis del tamaño de raíz obtenido en cada tratamiento del fermentado y sobrenadante a diferentes temperaturas de conservación en la planta de frijol.	105
Figura 41. Peso de raíz obtenido en cada tratamiento del fermentado y sobrenadante a diferentes temperaturas de conservación en la planta de frijol.	106

Figura 42. Peso seco de raíz obtenido en cada tratamiento del fermentado y sobrenadante a diferentes temperaturas de conservación en la planta de frijol. 106

Figura 43. Peso seco de nódulos obtenido en cada tratamiento del fermentado y sobrenadante a diferentes temperaturas de conservación en la Raíz de la planta de frijol. 107

Figura 44. Grado de severidad en Incidencia del hongo (*Rhizoctonia solani*) obtenido en cada tratamiento del fermentado y sobrenadante a diferentes temperaturas de conservación en la planta de frijol. 111

Figura 45. Ejemplo de Ensayo positivo de producción de sideróforos con el método Cas..... 134



Lista de abreviaturas

BCA : Agentes de Control Biológico o Biocontroladores, por sus siglas en idioma inglés: Biological Control Agents.

PGPM : Microorganismos promotores del crecimiento vegetal, por sus siglas en idioma inglés: Plant Growth Promoting Microorganism.

PGPR : Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, por sus siglas en idioma inglés: Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

PGPB : Bacterias promotoras del crecimiento vegetal, por sus siglas en idioma inglés: Plant Growth Promoting Bacterium.

BPCV : Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

PGP : Estimulación del crecimiento vegetal, por sus siglas en idioma inglés: Plant growth promoting.

AIA : Acido indol acético

Inoculación: Para este caso, introducción de un microorganismo en el sistema con un fin determinado BCA y PGPM

g/L : Gramo/Litro

g : Gramos

mg : Miligramos

µg : Microgramos

L : Litros

mL : Mililitros

µL : Micro litros

h : Horas

F t.amb : Fermentado sometido a conservación por temperatura ambiente.

F 4°C : Fermentado sometido a conservación de cuatro grados.

F -20°C : Fermentado sometido a conservación de menos veinte grados.

F lio : Fermentado sometido a conservación de Liofilizado.

S t.amb : Sobrenadante sometido a conservación por temperatura ambiente.

S 4°C : Sobrenadante sometido a conservación de cuatro grados.

S -20°C : Sobrenadante sometido a conservación de menos veinte grados.

S lio : Sobrenadante sometido a conservación de Liofilizado.

Pat : Patógeno (*Rhizoctonia solani*)

CQ : Control químico

HOMAI : Es un fungicida desinfectante que ofrece una protección contra el ataque de hongos que ocasionan fuertes daños, especialmente durante la germinación y los primeros estados de desarrollo.

HIPOTESIS

Debido a que las cepas de género *Bacillus.sp*, presenta gran potencial de producción de metabolitos y efecto antagonista en patógenos de cultivo, la bacteria nativa de la rizósfera de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), en fermentación *Batch* a nivel de biorreactor, podría presentar actividad promotora de crecimiento vegetal (PGP) y actividad antifúngica contra el hongo *Rhizoctonia solani*, a nivel *in vitro* e invernadero, sin toxicidad en semillas de frijol, brócoli, rabanito, lechuga y tomate; estas características en estados de conservación de congelamiento y liofilizado es posible que puedan mantener su optimo efecto.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Caracterizar y conservar metabolitos del cultivo de *Bacillus.sp* en fermentación *batch* con capacidad promotora de crecimiento vegetal y biocontrol frente *Rhizoctonia solani*

Objetivos Específicos:

1. Determinar la presencia de metabolitos con actividad promotora del crecimiento vegetal a nivel *in vitro* y en semillas de interés comercial a partir del cultivo de *Bacillus.sp* en fermentación *batch* a nivel de biorreactor.
2. Determinar la presencia de enzimas hidrolíticas con actividad antifúngica contra *Rhizoctonia solani* a partir del cultivo de *Bacillus.sp* en fermentación *batch* a nivel de biorreactor.
3. Determinar el efecto de diferentes métodos de conservación en la actividad de metabolitos promotores del crecimiento vegetal y antifúngica a nivel de invernadero.

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO

1.1. METABOLITOS EN BACTERIAS

En los procesos metabólicos de las bacterias necesarios para su proliferación y crecimiento enfocamos a lo que se denomina metabolismo primario que está conformado por rutas bioquímicas en las que se sintetizan y se consumen diferentes sustancias, los cuales son utilizados en la obtención de energía, la reproducción celular y viabilidad.(21) La interacción de las especies microbianas en su ecosistema, puede estar determinada por muchos factores, incluyendo la habilidad de los microorganismos para liberar sustancias las cuales afectan el desarrollo de otras especies. Los metabolitos juegan un papel importante en la adaptación de las especies, formación y funcionamiento de las comunidades. Estos intermediarios son producidos en la etapa activa de crecimiento o fase exponencial en la curva de crecimiento microbiano, siendo algunos de ellos ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos, entre otros. Pero también existen procesos metabólicos que incluyen al metabolismo secundario son aquellos compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un papel directo en el crecimiento o reproducción del mismo el cual produce compuestos que comúnmente son excretados al medio donde crece la célula y que no poseen una importancia vital para la misma, la biosíntesis de metabolitos secundarios ocurre generalmente debido a condiciones de agotamiento de nutrientes en el medio, diferenciación y esporulación. Algunos ejemplos de metabolitos secundarios generados en estos momentos son los antibióticos, toxinas, alcaloides, enzimas, entre otros.(14) (22) Estos metabolitos producidos por unos pocos organismos, no parecen

ser esenciales para su crecimiento y reproducción; su formación es dependiente de las condiciones ambientales donde se encuentren. Para determinar estos metabolitos, es importante no solo conocer el género de la bacteria, sino también su especie, ya que actualmente este parámetro se emplea como un factor de aporte al estudio en nuevas investigaciones dando relevancia a sus antecedentes. Con el avance de la ciencia, el cultivo deliberado de estos microorganismos con expectativas a la producción de nuevas sustancias, han permitido cada vez más sus capacidades de biosíntesis.(23)

1.2. BIOLOGIA DE *Bacillus.sp*

El género *Bacillus.sp* pertenece a la familia *Bacillaceae*, es un género que hoy en día incluye más de 60 especies de *Bacillus.sp* ampliamente distribuidos en diversos ambientes como agua y suelo. En una etapa temprana de la clasificación de las especies del género *Bacillus.sp* se tienen en cuenta dos características fundamentales: el crecimiento aerobio, la respuesta positiva a la tinción de Gram, la forma bacilar y la formación de endospora (4), quimiheterotrofos que normalmente son móviles y rodeados de flagelos periticos. Son anaerobios o aerobios facultativos son catalasa positivos. Las células bacterianas de este género tienen un amplio tamaño que varía 0,5 a 2,5 μm x 1,2-10 μm .(18) Gracias a estas características notables tanto fisiológicas como morfológicas es que la especie sobrevive en la naturaleza con protección a condiciones extremas ocupando una gran variedad de hábitats.

Bacillus.sp, independientemente de su ubicación taxonómica, se encuentra entre los agentes más adecuados para el control biológico debido a cualidades tanto morfológicas como fisiológicas que permiten su ubicuidad en la naturaleza. Este género además ha tenido mucho éxito en la prevención de patologías vegetales causadas por hongos. Además, produce una gran diversidad de metabolitos, entre los que destacan: bacteriocinas, antibióticos y enzimas extracelulares (como proteasas y quitinasas), elementos clave en el fenómeno de supresión de patógenos por agentes biológicos.(24) Los metabolitos secundarios son producidos cuando la bacteria se encuentra en la fase denominada idiofase, es decir en la fase en que cesa el crecimiento

por parte de la bacteria. Incluidos en este grupo están un conjunto de compuestos que son de gran importancia como las sustancias antimicrobianas y nuevos compuestos importantes farmacológicamente tales como los agentes antitumorales o inmunomoduladores como la ciclosporina, que han adquirido importancia.

1.2.1. *Bacillus.sp* COMO PRODUCTOR DE METABOLITOS

Se ha demostrado de forma independiente de metabolitos sus potencialidades como control biológico de patógenos.(25) En este sentido se conoce que entre los mecanismos a través de los cuales transcurre este proceso se encuentran las relaciones de competencia, la producción de antibióticos, enzimas y de otras sustancias como sideróforos, que permiten a estos microorganismos ejercer su capacidad biocontroladora.(26)

También se han demostrado potencialidades como solubilizador de fosfatos y fijador de nitrógeno atmosférico. Se han realizado diversos estudios para utilizar este género bacteriano como promotor del crecimiento vegetal, entre las principales especies se destacan *Bacillus.sp*. El rápido crecimiento que muestran estas bacterias en cultivo líquido la formación de endosporas resistentes al calor y la desecación y la producción de metabolitos secundarios son características que permiten considerar a estos microorganismos como potenciales agentes de control biológico.(27)

Las especies de *Bacillus.sp* son ubicuas en la naturaleza y se encuentran en mayor proporción en los suelos, por lo que resulta de gran utilidad usar muestras de este tipo como fuente de inóculo para aislar cepas de este género, el uso de sus metabolitos, puede ser un método alternativo o suplementario para la protección de las plantas. Muchos de estos bacilos generalmente son bacterias que habitan en el suelo o existen como epífitas y endófitos en la espermósfera y la rizósfera,(28) por esta razón, las especies de *Bacillus.sp* son candidatos ideales para su uso como agentes de control biológico (BCA) en programas de tratamiento de semillas contra patógenos transmitidos por el suelo las especies de *Bacillus.sp* también se han aislado de muchos otros entornos como de hojas, compost, procesos de fermentación, etc.(29)

Los metabolitos secundarios son producidos cuando la bacteria se encuentra en la fase denominada idiofase, es decir en la fase en que cesa el crecimiento por parte de la bacteria. Incluidos en este grupo están un conjunto de compuestos que son de gran importancia como las sustancias antimicrobianas y nuevos compuestos importantes farmacológicamente tales como los agentes antitumorales o inmunomoduladores como la ciclosporina, que han adquirido importancia recientemente.(30)

1.2.2. ROL DE LOS METABOLITOS

Los productos de la biotecnología se aplican hoy a un gran número de industrias entre las que cabe mencionar no sólo la alimenticia, sino también la farmacéutica, textil, del papel, de detergentes, etc. Antes del advenimiento de la ingeniería genética ya se obtenían diversos productos (metabolitos) derivados de bacterias.(31)

Las interacciones planta-animal son generalmente mediadas por metabolitos secundarios y a menudo implican mecanismos de defensa. Muchas bacterias asociativas son consideradas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), debido a su capacidad para estimular directamente el crecimiento de las plantas, a través de diversos mecanismos, como el aporte de sustancias generadas por las bacterias resultan nutrientes favorables.

Los metabolitos primarios, compuestos de bajo peso molecular que participan como productos intermediarios en las diversas rutas metabólicas, se sintetizan durante la fase exponencial, en tanto que los de tipo antibiótico o metabolitos secundarios, se producen en la fase estacionaria e intervienen en vías biosintéticas específicas del proceso celular como productos finales. Su producción requiere un incremento en la biomasa del microorganismo productor, condiciones nutricionales específicas y factores físico-químicos, como la temperatura y los pH definidos para cada especie, Así como, otro tipo de condiciones de incubación (agitación, tiempo de incubación, aireación, tamaño y edad del inóculo inicial) que definirán la adaptación del microorganismo y la producción de la biomolécula.

1.2.3. ENDOSPORACION DE *Bacillus.sp*

Las bacterias Gram positivas formadoras de endosporas se agrupan en el género *Bacillus.sp* y otros géneros relacionados, recientemente separados taxonómicamente. Estos microorganismos se han estudiado desde hace muchos años con fines industriales y agrícolas.(4)(32) Cuando las condiciones del ambiente son favorables, la espora regresa a crecimiento vegetativo mediante el proceso de germinación y eclosión reanudando su actividad metabólica.(33)

Las bacterias del género *Bacillus.sp* constituyen un grupo importante, este género incluye bacterias Gram positivas que tienen la ventaja de poseer diversos mecanismos para asegurar su sobrevivencia ante condiciones físicas desfavorables, bajo estas condiciones *Bacillus.sp* inicia una serie de respuestas; si estas respuestas fallan para poder mantenerse en estado vegetativo se induce la esporulación. La habilidad de las especies de *Bacillus.sp* de formar endosporas altamente resistentes al calor, desecación, irradiación UV, les confiere una ventaja competitiva muy importante en un ambiente como el suelo. Así mismo, *Bacillus.sp* también se debe adaptar a cambios bruscos de temperatura, para esto cuentan con genes de shock térmico inducibles que incluyen proteínas chaperonas y proteasas. *Bacillus.sp* tiene como hábitat natural el suelo y se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, entre sus principales características se encuentra su capacidad de crecer en un intervalo amplio de temperaturas desde 15 hasta 55 °C, presenta motilidad, aerotaxis, velocidades de crecimiento altas, sobrevive en concentraciones salinas (hasta el 7% de NaCl) y producir una amplia variedad de antibióticos y enzimas hidrolíticas extracelulares.

La germinación de las esporas inactivas de las especies de *Bacillus* es el primer paso crucial en el retorno de las esporas al crecimiento vegetativo y es inducida por nutrientes y una variedad de agentes no nutrientes. Los germinantes nutrientes se unen a los receptores en la membrana interna de la espora y esta interacción desencadena la liberación del enorme depósito de ácido dipicolínico y cationes del núcleo de esporas y el reemplazo de estos componentes por agua. Estos últimos eventos desencadenan la hidrólisis de la corteza del peptidoglicano de las esporas por parte de dos enzimas redundantes y la terminación de la hidrólisis de la corteza y la posterior expansión de

la pared germinal permite la hidratación del núcleo de las esporas, la reanudación del metabolismo de las esporas y la síntesis macromolecular.(34)

Una serie de mecanismos son responsables de la resistencia de las esporas de las especies de *Bacillus.sp* como el ser resistente al calor, a la radiación, a la desecación, pH extremos y productos químicos tóxicos.(35) Además de los nutrientes, las esporas son germinadas por otros agentes, incluyendo lisozima, sales, altas presiones y tensoactivos catiónicos como la dodecilamina. Aunque estos agentes "no nutrientes" probablemente no sean fisiológico, usan varios de los componentes del vía de germinación de nutrientes. Además, es posible que liberado de una espora puede estimular la germinación de otras esporas vecinas. El dormido la espora también monitorea su ambiente y cuando las condiciones son nuevamente favorables para el crecimiento, la espora germina y pasa a través de una excrecencia, finalmente se convierte de nuevo en una célula en crecimiento (36), la germinación de esporas ha atraído interés aplicado.

1.2.4. APLICACIÓN BIOTECNOLOGICA

La biotecnología ha abierto nuevas posibilidades para la introducción de microorganismos benéficos en el suelo con el fin de promover el crecimiento de las plantas y llevar a cabo un control biológico de patógenos presentes en los suelos, por lo tanto, el aislamiento y selección de microorganismos habitantes de manera natural en el suelo que formen parte del mismo hábitat de forma simbiótica que reúnan esas características y que presenten alta capacidad de sobrevivencia y de colonización radicular y versatilidad metabólica, continua siendo de interés(37) para desarrollar tecnología para una mejor calidad obteniendo estos elementos en mayor cantidad. Constituyen una alternativa eficiente y ecológica que contribuye al desarrollo de una agricultura sostenible, ya que disminuye los efectos inherentes al uso excesivo de plaguicidas y productos químicos. Entre los agentes de control biológico más estudiados se encuentran los microorganismos pertenecientes a los géneros *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, presentes en la familia de *Bacillus.sp*.

Estas técnicas nuevas, nos permiten tener nuevas referencias para seguir evolucionando, de este modo permiten el estudio de diferentes complicaciones como la virulencia (severidad de la enfermedad) y la patogenicidad (la habilidad para causar enfermedad), la identificación y tipificación (análisis de la similitud o diferencia relativa a otras cepas) de cepas (bacterias descendientes de un mismo aislamiento cultivado), la síntesis de diferentes elementos, la evolución y dispersión de bacterias y la expresión y regulación de genes. Estos descubrimientos se están realizando tanto con variantes bacterianas naturales y como con mutantes obtenidos en el laboratorio. Se espera que estos hallazgos permitan un mejor manejo de las enfermedades.

1.3. PROMOCION DE CRECIMIENTO VEGETAL (PGP)

El uso a largo plazo de los fertilizantes y pesticidas artificiales termina por provocar efectos nocivos en los mismos cultivos. Dada la difícil degradación de los compuestos que los forman, pueden acarrear problemas de magnificación a través de las cadenas tróficas hasta el punto de afectar la salud de animales y humanos.(38)

Los primeros mecanismos propuestos para la promoción bacteriana del crecimiento vegetal han sido relacionados con el metabolismo de las hormonas vegetales y sus efectos. Estarían relacionado con la capacidad de este microorganismo para producir o metabolizar compuestos del tipo fitohormonas

La producción de fitohormonas por parte de las bacterias y su impacto en la morfogénesis de la raíz, podrían explicar en gran parte los efectos positivos de las bacterias diazotróficas en el crecimiento vegetal. Al incrementarse el número de pelos radicales y raíces laterales, existe mayor absorción de agua y nutrientes por la planta (39) y un mayor intercambio con el ambiente de la rizósfera, lo que contribuye a incrementos en el rendimiento del cultivo.

La promoción del crecimiento vegetal por parte de las especies del género *Bacillus.sp* puede ocurrir de forma directa o indirecta. Un efecto directo sobre la promoción del crecimiento vegetal se observa en bacterias rizosféricas que tienen la capacidad de llevar a cabo la fijación biológica del nitrógeno, la solubilización de minerales como

el fósforo y la producción de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal. Por su parte, la forma indirecta de promoción del crecimiento vegetal está relacionada con la producción de sustancias que actúan como elementos que le confieran a ser aprovechados para la planta en su desarrollo y algunos otros de efecto antagonistas de patógenos o induciendo resistencia en las plantas.(40)

1.3.1. MICROORGANISMOS Y SOLUBILIZACION DE FOSFATOS

Los suelos agrícolas contienen grandes cantidades de fosfatos insolubles que solo pueden convertirse en formas asimilables para las plantas mediante la acción microbiana. Las bacterias solubilizadoras de fosfato mejoran la disponibilidad de este nutriente en el suelo y desempeñan un papel fundamental en la nutrición de las plantas. Los géneros bacterianos con mayores potencialidades de uso son *Pseudomonas* y *Bacillus.sp.* Sus principales mecanismos de acción incluyen la producción de ácidos orgánicos, la quelación de los elementos responsables de la insolubilidad de los fosfatos presentes y asimilación directa de fosfatos insolubles, lo que está relacionado con la fuente de P disponible. La elaboración de inoculantes a partir de estas bacterias permitiría reducir a largo plazo el uso de productos químicos en la agricultura, así como desarrollar estrategias agronómicas que preserven el medio ambiente.

Uno de los principales motivos de la disponibilidad limitada se debe a la unión de los aniones fosfato con otros elementos (*Tabla 1*), con los que forma complejos poco solubles, como los Fosfatos de hierro ($FePO_4$) o aluminio ($AlPO_4$) en suelos ácidos y Fosfatos de calcio [$Ca_3(PO_4)_2$] en suelos alcalinos.(41)

Los microorganismos han demostrado cumplir funciones que mantienen el equilibrio del suelo y apoyan el crecimiento vegetal mediante diversos mecanismos, entre ellos la solubilización de fosfatos, por el cual se logra liberar el ion fosfato accesible para la planta. Este elemento se encuentra limitado en el suelo y es un nutriente vital después del nitrógeno para el desarrollo de la planta. El género *Bacillus.sp.* se ha destacado como un potencial solubilizador de fosfato y puede ser utilizado como biofertilizante que va a permitir obtener un producto agrícola de calidad y sin generar consecuencias al ambiente.

Tabla 1. Formas de fósforo presentes en el suelo

Tipo de fosfato	Denominación	Composición	Características
Fosfatos de calcio	Hidroxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ $\text{Ca}(\text{OH})_2$	Muy abundante
	Oxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaO}$	Menos abundante
	Fluoroapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaFe}_2$	Muy abundante
	Carbonatoapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaCO}_3$	Menos abundante
	Fosfato tricálcico	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Menor solubilidad
	Fosfato dicálcico	CaHPO_4	Mayor solubilidad
	Fosfato monocálcico	$\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2$	Mayor solubilidad
Fosfatos de hierro	Livianita	$\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	Poco solubles
	Estrengita	$\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Poco solubles
Fosfato de aluminio	Variscita	$\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Poco solubles

Fuente: Bobadilla et al, 2008 (12)

La conversión de fosfatos inorgánicos disponibles para la planta y microorganismos en formas orgánicas no disponibles se denomina inmovilización; el proceso contrario es la mineralización, que se define como la conversión de formas orgánicas a ortofosfatos (H_2PO_4 o H_3PO_4), el fósforo orgánico puede ser mineralizado como subproducto de la mineralización de la materia orgánica del suelo o mediante la acción de enzimas específicas que son reguladas por la demanda de este nutriente.(42) Estas fosfatasas son liberadas por los microorganismos extracelularmente, a partir de este momento pueden ser tomadas por las plantas, inmovilizado en las células microbianas o puede formar complejos inorgánicos insolubles

Uno de los principales mecanismos de la solubilización de fosfatos es a través de la excreción de ácidos orgánicos al medio.(43) Esto ocurre debido a que se lleva a cabo un intercambio catiónico que permite que el fosfato insoluble se convierta a formas solubles, por lo que el mismo podría estar disponible para la planta. Dentro de los ácidos orgánicos excretados más comunes se encuentran el ácido cítrico, ácido láctico, ácido succínico y el ácido propiónico, siendo este último uno de los principales

compuestos utilizados por especies como *Bacillus megaterium* para llevar a cabo la solubilización de fosfatos.(43)

1.3.2. PRODUCCION DE ACIDO INDOL ACETICO

La producción bacteriana de Acido Indol Acético (AIA) fue estudiada no solo por su efecto fisiológico en las plantas, sino también por la función que pueda desempeñar esta fitohormona en la interacción planta-microorganismo,(44) demostrando que varios procesos del crecimiento de las plantas estaban regulados por sustancias como esta que se transportan de una parte de la planta a otra. En las últimas décadas se han ido identificando nuevas hormonas vegetales, que incluyen auxinas como el ácido indol-3-acético (AIA), ácido abscísico (ABA), brasinoesteroides (BRS), citoquininas, giberelinas, etileno, ácido jasmónico (AJ) y ácido salicílico (AS).(45)

Trataremos a las auxinas con mayor importancia debido que este compuesto se caracteriza por su capacidad de inducir elongación en células e intervenir en muchas etapas de su desarrollo. La auxina natural de mayor distribución es el ácido 3-indolacético (AIA), aun cuando el ácido 4-cloroindol-3-acético ha sido aislado de plantas superiores. En general este grupo de hormonas afecta otras características fisiológicas, además de la elongación, pero esta acción es considerada crítica, aun en la formación o síntesis de otras de las hormonas importantes para las plantas,(46) como también en el aumento de la extensibilidad de la pared celular, participación en la diferenciación celular, estimulación de foto y gravitropismos, estimulación del desarrollo del fruto luego de la fecundación, regulación de la abscisión, participación en el fenómeno de dominancia apical, también reguladoras del balance osmótico en razón de regir la concentración citoplasmática de electrolitos, etc.(47) También se vieron mejoras en el desarrollo de las plántulas en el periodo de adaptación en un ambiente natural y en invernadero notando resultados de mayor vigorosidad y uniformidad en los cultivos.

1.3.2.1. ACIDO INDOL ACETICO EN GERMINACION DE SEMILLAS

El papel de AIA en la germinación de semillas ha sido controvertido ya que hay informes contradictorios que sugieren que puede inhibir la germinación o aumentar el vigor de la semilla. Los efectos contradictorios informados pueden estar relacionados con las concentraciones, Curiosamente, cuando se aplican dosis bajas exógenamente, mejora significativamente la germinación de semillas, pero debemos entender que esto no significa que requieren poco de esta hormona sino al contrario la planta lo requiere en básicamente todo su ciclo de vida.(48) La propagación de plantas por medio de semillas es de gran importancia debido a que interviene en gran parte en el mantenimiento de la diversidad de las especies, contrario a lo que ocurre con los métodos de propagación asexual o vegetativa, por lo que se ha mencionado la necesidad de implementar mecanismos de propagación eficientes para la conservación y mantenimiento de sus poblaciones en el campo. En cactáceas, algunos autores han sugerido la necesidad de aplicar métodos químicos para incrementar la respuesta germinativa de las semillas; así por ejemplo, la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas pueden ser controlados por la aplicación exógena de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) en concentraciones fisiológicas que pueden actuar como promotoras e inhibidoras de ambos procesos como la influencia de AIA. Los RCV constituyen un grupo de compuestos orgánicos que influyen en diversos procesos fisiológicos, principalmente crecimiento, diferenciación y desarrollo.(49)

1.3.3. SIDEROFOROS COMO PGP

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular (500 - 1500 Da), los que se puede obtener por fuentes como síntesis bacteriana, principalmente Gram negativas, hongos y plantas monocotiledóneas, que presentan grupos funcionales que coordinan los iones (Fe_3^+) con elevada afinidad y especificidad.(50) Cabe destacar que la mayor parte de los sideróforos descubiertos hasta la fecha son sideróforos de bacterias terrestres.(51)

Químicamente los sideróforos son compuestos quelantes de metales secretados por microorganismos creciendo en condiciones de bajas concentraciones de hierro. Varios factores ambientales pueden modular la síntesis de sideróforos, incluyendo el pH, los niveles de hierro y sus formas químicas, la presencia de otros elementos traza y una adecuada fuente de carbono, nitrógeno y fósforo,(52) lo que los hace formar parte de la cadena de requerimientos como la competencia por nutrientes, minerales, espacio, la detoxificación de factores de virulencia de los patógenos, la inducción de resistencia sistémica en la planta y la síntesis de metabolitos como los antibióticos, los sideróforos son algunos de estos mecanismos importantes.(53)

La necesidad de la existencia de estos sideróforos intracelulares podría deberse a la gruesa envoltura lipoproteína que presentan estas especies bacterianas en su pared.(54) Así mismo esta actividad puede ser considerada como un mecanismo directo al influir en el desarrollo vegetal gracias a la solubilización del hierro no soluble presente en el medio, convirtiéndolo a formas biológicamente disponibles para las plantas. Entre los mecanismos directos se explicó el papel nutritivo de los Sideróforos producidos por las PGPR, sin embargo, también cumplen una función como factores de biocontrol. Por el mismo mecanismo que emplean para captar los metales, los Sideróforos comprometen el desarrollo de Fito patógenos que pueden infectar la planta, ya que estos también requieren de estos metales para su correcto crecimiento.(55)

1.4. ANTAGONISMO MICROBIANO

El antagonismo está dado por la presencia y actividad de organismos que pueden afectar o interferir a la densidad de la población, dinámica y actividades metabólicas de los patógenos presentes. La rizósfera es el patio de infección donde los patógenos del suelo establecen una relación parasitaria con la planta. Sin embargo, la rizósfera es también un campo de batalla donde la compleja comunidad, tanto la micro flora como la micro fauna, interactúa con patógenos transmitidos por el suelo e influye en el resultado de la infección por patógenos.(56) Los mecanismos de antagonismo están relacionados con el número de especies en contacto y la especificidad de las interacciones, ya sea de forma directa o indirecta. Las PGPR protegen a las plantas

contra los patógenos por interacciones de antagonismo directo las cuales son producto del contacto físico y/o de un alto grado de selectividad del patógeno por los mecanismos expresados como Agentes de Control Biológico o Biocontroladores (ACB), como el hiperparasitismo y la predación. Asimismo, por síntesis de metabolitos secundarios antimicrobianos, enzimas líticas y por producción de ácido cianhídrico que suprime el crecimiento de patógenos fúngicos.(57) Entre tanto, el antagonismo indirecto resulta de las actividades que no involucran contacto del patógeno con el ACB, como la estimulación de las vías de defensa de la planta por ACB no patógenos induciendo resistencia.(58) (59)

1.5. ENZIMAS HIDROLITICAS

Los microorganismos producen compuestos tales como metabolitos y enzimas extracelulares con gran potencial industrial y otros usos prometedores, Muchas de estas enzimas pueden ser estables y activas en más de una condición extrema, como elevada salinidad y temperatura, y/o amplio rango de pH. Actualmente, diversos procesos industriales se llevan a cabo en estas condiciones exigentes como en la hidrólisis del almidón, celulosa, proteasas entre otros.(60)

La producción de enzimas líticas por parte de las bacterias supone otro mecanismo de biocontrol. Algunas de estas enzimas son quitinasas, celulasas, lipasas o proteasas que tienen la capacidad de hidrolizar partes de la pared celular de muchos hongos Fito patógenos.(61) Cabe destacar, que de entre todos los antibióticos descubiertos hasta la fecha, algunos de ellos presentan cierta eficacia en experimentos farmacéuticos, dando lugar a una nueva fuente de fármacos con el fin de luchar contra las patógenos multirresistentes.

Las bacterias poseen diferentes mecanismos de acción para la inhibición del crecimiento fúngico *in vitro*; por un lado la producción de metabolitos anti fúngicos difusibles al medio como antibióticos y sideróforos, metabolitos volátiles como la inducción de resistencia con la producción de enzimas líticas de pared como proteasas, amilasas, celulasas y quitinasas(62) que en los hongos producen la lisis de hifas.

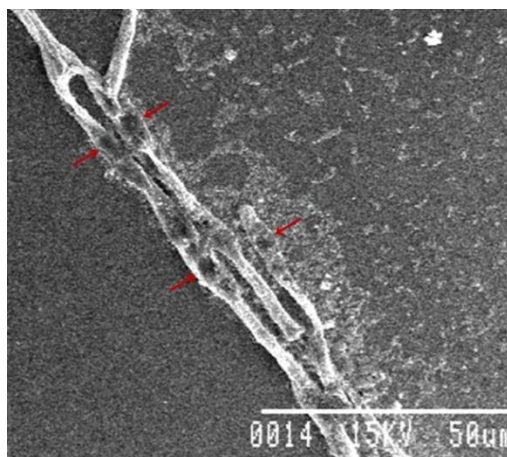


Figura 1. Microfotografías electrónicas de barrido que muestran el efecto antagonista de ETR17 sobre *Rhizoctonia solani* ; La lisis de las hifas fúngicas está indicada por flechas.(63)

La función que más repercutirá en el hongo hospedero de las enzimas producidas será degradar los componentes de la matriz extracelular y de ésta forma lesiona la estructura de los tejidos de hifas del hospedero, (Figura 1) lo que facilitara la penetración de otras sustancias o bacterias, para dar paso al término de su virulencia, las enzimas hidrolíticas también proveen de fuentes de carbono y energía rompiendo los polímeros del hospedero en azúcares y aminoácidos de bajo peso molecular.(62) A pesar del hecho de que las enzimas hidrolíticas producidas por bacterias causan daño a los tejidos, dichas enzimas no son clasificadas como toxinas porque generalmente no matan a las células del hospedero o no causan un daño metabólico identificable pero si les impide una mayor proliferación o que la infección se expanda.(64)

1.5.1. ACTIVIDAD AMILOLITICA

La mayoría de los patógenos utilizan el almidón y otras reservas de polisacáridos, en sus actividades metabólicas, la degradación de carbohidratos como del almidón es llevada a cabo por la acción de enzimas llamadas amilasas, las cuales al actuar producen diversos productos como dextrinas, maltosa o glucosa siendo esta ultimas el resultado completo de la hidrolisis, la cual finalmente es usada por los microorganismos directamente.(65)

La fuente bacteriana es la preferida industrialmente por su crecimiento rápido y medios de cultivo poco exigentes. Así, las bacterias productoras de amilasas más descritas pertenecen al género *Bacillus*.sp.(60) Las amilasas se dividen en dos categorías las endoamilasas y las exoamilasas. Las endoamilasas como la α -amilasas y α -1,6 glucosidasa catalizan la hidrólisis al interior de la molécula en forma aleatoria, directamente donde encuentre los enlaces α -1,4 glucosídicos y α -1,6 glucosídicos (ramificación), esta acción causa la formación de oligosacáridos y dextrinas, las exoamilasas como la β -amiasa y la amiloglucosidasa actúan a partir del extremo libre no reductor catalizado la hidrólisis al exterior de la molécula cada dos o cada una unidad de glucosa, produciendo maltosa y glucosa respectivamente.(66) De esta forma la acción de cada una de las enzimas mencionadas anteriormente, logra una degradación completa del almidón, así mismo su acción es inducible y su producción depende del tipo del almidón empleado, la de mayor distribución es la α -amilasa.(67)

El almidón y la celulosa son las dos fuentes de carbono más distribuidas en la naturaleza. Estos polímeros están compuestos de unidades de glucosa y se requieren de diferentes sistemas enzimáticos para degradarlos.(68) Los grupos microbianos con actividad amilolítica juegan un papel fundamental en nutrientes a nivel de suelo, pues actúan sobre el almidón gracias a la producción de enzimas amilasas, liberando glucosa que es un sustrato más fácilmente asimilable por el resto de las poblaciones heterótrofas de microorganismos con el fin de estímulo en los suelos(68)

1.5.2. ACTIVIDAD CELULOLITICA

Las enzimas celulíticas que secretan los microorganismos tienen una importancia en el ablandamiento y desintegración de la pared celular y además permiten llegar a una desintegración de la pared celular lo que facilita de destrucción de la enfermedad.(69) Además las enzimas celulolíticas participan de manera indirecta en la eliminación de la enfermedades, al liberar de las cadenas de celulosa, azúcares solubles que sirven de alimento restante en el suelo, en las enfermedades vasculares, al liberar en las corrientes vasculares grades moléculas de celulosa que dificultan el movimiento normal del agua a la planta. (70)

En los microorganismos que producen celulasas, estas pueden estar formando complejos unidos a la membrana celular llamados celulosomas, como en las bacterias anaerobias (especialmente, *Clostridium* spp.) y algunos hongos.(71)

La celulosa se encuentra embebida en una matriz compuesta de un número de moléculas (pectinas, proteínas, almidón y lípidos)

En las aplicaciones agronómicas de las celulasas es que degradan *in vitro* celulosa de las paredes celulares de microorganismos como Oomicetos, además de en conjunto con las quitinasas que catalizan la hidrólisis de quitina y de los β -1,3 glucanos de las paredes celulares de microorganismo Deuteromicetos.(72)

1.5.3. ACTIVIDAD PROTEOLITICA

Las proteasas excretadas por los microorganismos producen aminoácidos y oligopeptidos al hidrolizar los enlaces peptídicos. Los péptidos son hidrolizados por las exopeptidasas y las endopeptidasas. Las exopeptidasas se dividen en dos grupos. las que comienzan su acción por el enlace peptídico adyacente al grupo amino terminal y las que lo hacen por el cercano al carboxilo terminal.(73)

Las proteínas son consideradas de gran importancia porque constituyen las membranas celulares de componentes estructurales en las paredes celulares, la degradación de estas por las enzimas proteolíticas o también llamadas proteasas secretadas pueden ser de gran ayuda porque afectan profundamente la organización y función de un gran número de células de los patógenos. (74)

1.5.4. ACTIVIDAD QUITINOLITICAS

La quitina es el polímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa, está formada por aminoazúcares unidos entre sí por enlaces glicosídicos β -(1 \rightarrow 4), que forman una cadena lineal.(75) Las quitinasas se les conoce como una herramienta natural con actividad biológica enzimática que degrada la quitina por lo que se dice propiedades anti fúngicas. Gracias a estos hechos , la síntesis e hidrólisis de la quitina

permite el crecimiento y desarrollo de algunas especies capaces de utilizar la quitina como fuente de carbono.(76) Adicionalmente la aplicación positiva de la producción de quitinasas es poder elaborar un producto que controle organismos clasificados como plaga que afecta alimentos producidos de manera agrícola, en el área de la biotecnología , para el biocontrol tanto de hongos como insectos, se puede generar insecticidas con quitinasas para elevar el efecto teniendo un agente mucho más potente aplicado en menos concentración y mayor efectividad.(77)

1.6. BIOLOGIA DE *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani es un basidiomiceto que se reproduce asexualmente y se encuentra en suelo en forma de micelio y/o esclerocios debido a la ausencia de conidios y la escasez de esporas sexuales.(78)

Rhizoctonia solani hongo causante de la enfermedad conocida como podredumbre puede causar pérdidas severas en los rendimientos hasta en la totalidad de la cosecha ya que puede atacar en las primeras semanas de enraizamiento; A presencia del hongo *Rhizoctonia solani* en diferentes cultivos se torna un factor limitante importante para la producción, en las plantas afectadas presentan defectos como en su tamaño siendo estas más pequeñas y marchitas.(79) La raíz principal se deforma. En casos muy severos, cerca de las plantas muertas se forman pequeñas estructuras redondas, negras, parecidas a granos de arena. Por lo que se requiere tomar medidas para las condiciones del hongo que sobrevive en restos de cosechas anteriores, por lo que el daño aumenta cuando se cultiva frijol u otros productos en el mismo sitio por varios años.

Puede permanecer en el suelo como saprófito por largos periodos de tiempo y se dispersa vía esclerocios ya sea por el agua, viento o durante prácticas agrícolas. Se caracteriza por ser un parasito no obligado, patógeno del suelo, causando damping-off en numerosas especies de plantas como consecuencia del estrangulamiento y la necrosis del tallo a nivel del cuello, reduciendo significativamente su vigor.

1.6.1. DISEMINACIÓN DE *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani produce esporas sexuales aéreas que son expulsadas al aire y esparcidas por el viento. Los patógenos pueden moverse por encima del suelo con agua de riego o escorrentía de lluvia, que puede transportar partículas de tierra a los campos adyacentes.(80)

De hecho, son los propios vegetales quienes constituyen el origen de la contaminación más importante. Este patógeno está presente sobre un gran número de plantas huésped, puede ser ciclamen cultivado en invernadero u otras plantas cultivadas al exterior de los invernaderos.

En consecuencia, todo suelo no descontaminado es considerado como potencialmente infeccioso.(81) Los esclerótidos pueden vivir numerosos años en estado saprofita sobre restos vegetales. Germinan sobre la acción de secreciones radicular es emitidas por la planta cuando las condiciones climáticas son favorables.

Dotado de una fuerte aptitud saprofita, el micelio se desarrolla rápidamente en el suelo hasta que la planta es infectada. Las condiciones favorables son: pH del sustrato superior a 5,8 y a temperatura del sustrato del orden de 15 a 35°C, con sustrato seco o húmedo.

1.6.2. INFECCIÓN

El hongo es atraído a la planta por estimulantes químicos liberados por las células de plantas que crecen activamente y / o residuos de plantas en descomposición. A medida que el proceso de atracción continúa, la hifa de hongos entrará en contacto con la planta y se unirá a su superficie externa.(82) Después del apego, el hongo continúa creciendo en la superficie externa de la planta y causará enfermedad al producir una estructura de infección especializada (ya sea un appresorium o cojín de infección) que penetra en la célula vegetal y libera nutrientes para el crecimiento y desarrollo de hongos continuos.(15) El proceso de infección se promueve mediante la producción de muchas enzimas extracelulares diferentes que degradan diversos componentes de las paredes celulares de las plantas (por ejemplo, celulosa, cutina y pectina). A medida

que el hongo mata las células vegetales, las hifas continúan creciendo y colonizando el tejido muerto, formando con frecuencia esclerocios.(81) El inóculo nuevo se produce sobre o en el tejido huésped y se repite un nuevo ciclo cuando nuevos sustratos están disponibles.

1.6.3. SÍNTOMAS

Rhizoctonia solani ataca principalmente las partes subterráneas de las plantas como, semillas, hipocótilo y las raíces, pero también es capaz de infectar partes de la planta por encima del suelo (por ejemplo vainas, frutas, hojas y tallos).(83) El síntoma más común de la enfermedad de *Rhizoctonia solani* se conoce como "amortiguación" que se caracteriza por la no germinación de semillas gravemente infectadas, mientras que las plántulas infectadas pueden ser sacrificadas antes o después de que salgan del suelo.(15) Las plántulas infectadas no muertas por el hongo a menudo tienen cáncer, que son lesiones rojizas marrones en tallos y raíces. Además de atacar partes de la planta bajo tierra, el hongo infectará de vez en cuando la fruta y el tejido de la hoja localizados cerca o en la superficie del suelo. Este tipo de enfermedad ocurre a menudo porque el micelio y/o esclerocios del hongo están cerca o salpicado en el tejido de la planta.(84)

1.7. CULTIVO TIPO BATCH

La forma de trabajo de un biorreactor o fermentador (*Figura 2*) como comúnmente se le llama esencialmente se divide en dos: la primera es mediante la alimentación continua del sustrato a fermentar en éste; la segunda forma es por lotes o tipo batch, es decir, sólo se deposita una cierta cantidad de materia para ser fermentada. Es el tipo de fermentación más habitual. Al inicio del proceso, el biorreactor se esteriliza junto con el medio y precedentemente se inocula con el número adecuado de microorganismos es decir el inóculo a partir de aquí se da inicio al proceso en las condiciones óptimas requeridas.(85) En el desarrollo del proceso no se le añade ningún nutriente o componente al medio, con excepción de oxígeno si es requerido.(86) Llega un momento, por lo tanto, en que los nutrientes son limitantes para el crecimiento, por lo

que se dan las fases típicas del crecimiento microbiano. Se interrumpe el proceso y se recupera el producto (antes de la fase de muerte), se vacía el reactor, para proseguir con un proceso nuevo.



Figura 2. Tanque fermentado tipo batch

1.8. TEMPERATURAS DE CONSERVACION

La conversión de un material líquido mediante metodologías como congelado y liofilización y ha venido en auge durante los últimos años, sin embargo aunque aumentan la estabilidad del producto y mejora la manipulación, puede conducir a pérdidas desde el punto de vista nutracéutico,(87) son dos los fundamentales motivos es mantener el estado y calidad de los componentes y evitar la contaminación por algún otro microorganismo oportunista.

El método de conservación que se elija debe garantizar la supervivencia de al menos el 70 % de las células por un período considerable de tiempo, de forma tal que la población sobreviviente se asemeje a la original como sea posible, conserve las propiedades de importancia de los cultivos y minimice la ocurrencia de los eventos genéticos.(88) De igual manera debe reducir al mínimo el riesgo de contaminación y permitir que la pureza del cultivo permanezca inalterable.

La aplicación del frío es uno de los métodos más extendidos para la conservación de las características iniciales, (87) brindando seguridad y reducen los riesgos de pérdida durante el almacenamiento, el frío va a inhibir los agentes alterantes de una forma total o parcial.

Las ventajas son numerosas, por un lado permiten conservar los componentes a largo plazo, A pesar de las bajas temperaturas en las que se encuentran congelados existen enzimas todavía activas, ya que a las temperaturas normales de congelación (-18°C) no todo el agua está congelada, existe muchas más sustancias como los metabolitos que aún se mantienen preservadas debido a que todavía contienen agua en estado líquido.(89) (90)

Actualmente se valoran métodos alternativos que sean eficientes para disminuir los costos de la conservación por largo plazo. Además se hace referencia a la formulación y estabilidad en almacenaje de los bioplaguicidas fúngicos, como un punto importante para obtener el producto final.(91)

1.9. CONSERVACION POR LIOFILIZADO

La liofilización es un proceso de conservación mediante el estado de sublimación con el fin de reducir las pérdidas de los componentes, conservando todo producto biológico conocido, debido a que no hace uso de productos químicos lo que permite ser adecuado para preservar células, enzimas, levaduras, sueros y derivados, entre otros.

El objetivo de la liofilización es obtener un producto seco, que cuando se le vuelve a añadir agua o disolvente, presente las mismas características que el producto original (forma, color, aroma, sabor y textura). La liofilización reduce las pérdidas de calidad

debidas al deterioro de la muestra por reacciones químicas y/o por degradación enzimática.

finalmente en este proceso de secado los productos obtenidos no se ven alterados en sus propiedades y se rehidratan fácilmente, lo más adecuado para no perder su concentración es que sea con su volumen inicial .(92) (89)

El proceso de liofilización puede describirse en fases:(93)

Primero el producto es **pre congelado** o inicial para asegurar una estructura inicial sólidamente congelada. Se debe congelar rápidamente el producto a una temperatura por debajo de su punto eutéctico, que es (la temperatura más baja a la que puede fundir una mezcla de sólidos con una composición dada).

En líneas generales se puede decir que una congelación adecuada es la base de que el producto liofilizado presente óptimas condiciones de aspectos, conservación de sus propiedades originales y rápida rehidratación.

Después se procede con el **secado primario** o sublimación durante el cual 90 a 95% del agua es retirada es la etapa en la que la mayor parte del agua libre pasa a vapor. Los parámetros temperatura, presión y tiempo pueden ser modificados independientemente pero están íntimamente relacionados, no es posible modificar, sin que se afecten los otros, por lo que en todo momento deben ser considerados conjuntamente y analizados sus efectos.

Y finalmente el producto es sometido a **secado secundario** o desorción, para retirar el agua restante Su misión es eliminar las últimas trazas de vapor de agua, evaporando el agua no congelada ligada al producto. Se lleva a cabo a una temperatura inferior a la de desnaturalización del producto y se logra una humedad final hasta valores inferiores al 1 %.

El proceso se lleva a cabo a vacío, es preciso eliminar el aire y otros vapores no condensables de la cámara a fin de facilitar la migración del vapor. Con respecto al Calentamiento, habitualmente se trabaja a temperatura ambiente, pero si es necesario, se puede calentar la muestra congelada con mucho cuidado para acelerar el proceso de secado. Esta fase no es conveniente si los productos pueden variar sus propiedades por encima de la temperatura ambiente. Finalmente la etapa de condensación (o

sublimación inversa) se da la Fijación de las moléculas de agua en forma de hielo sobre la superficie del condensador del liofilizador.(94)

1.10. CULTIVOS CON IMPORTANCIA

1.10.1. *Phaseolus vulgaris* (FRIJOL)

El frijol está dentro del grupo de las especies leguminosas, tenemos como frijol común como una de las más importantes. Es una planta anual, herbácea intensamente cultivada desde la zona tropical hasta las templadas. Es originario de América y se le conoce con diferentes nombres: poroto, haricot, caraota, judía, aluvia, habichuela y otros.(95)

Se utiliza cada vez más como materia prima en el desarrollo de nuevos productos para diversificar su uso y proporcionar a los consumidores alimentos con alto valor nutracéutico y nutricional. (96) También conocido como Fréjol Peruano, se produce en toda la costa y valles interandinos del Perú. Por su excelente textura y sabor es el preferido por la mayoría de exigentes Chefs latinos, su origen está en la Región norte y sur del Perú, en nuestro país la época de cosecha esta entre junio y julio. (95)

La planta de frijol necesita entre 300 a 400 mm de lluvia. La falta de agua durante las etapas de floración, formación y llenado de vainas afecta seriamente el rendimiento. El exceso de humedad afecta el desarrollo de la planta y favorece el ataque de gran número de enfermedades.(97) Se recomienda que los suelos para el cultivo de frijol sean profundos, fértiles, preferiblemente de origen volcánico con no menos de 1,5% de materia orgánica en la capa arable y de textura liviana con no más de 40% de arcilla como los de textura franco, franco limosos y franco arcilloso ya que el buen drenaje y la aereación son fundamentales para un buen rendimiento de este cultivo.(98)

1.10.2. *Brassica oleracea* (BROCOLI)

El nombre común es brócoli es de la familia *Brassicaceae* (*Cruciferae*). Es una planta herbácea es originario del mediterráneo oriental que llega a desarrollar una inflorescencia se distingue por su color verde intenso de uso comestible cuando aún no se encuentra completamente desarrollada, posee un tallo compacto del cual emergen grandes hojas de color verde oscuro y de superficie cerosa, la planta puede alcanzar una altura de 70 – 90 cm. antes de ser cosechada, si esto no sucede se producirá la floración y la calidad comestible se perderá dando lugar a la formación de cientos de pequeñas flores de color amarillo.(99)

Las mejores condiciones ambientales para su crecimiento se desarrollan en climas templado-fríos (donde las temperaturas mínimas son de 18°C y las máximas de 24°C). Requiere de abundante cantidad agua durante todo su cultivo, en especial durante el desarrollo de la inflorescencia, debido a que carencia de este elemento puede ocasionar su floración prematura.(100)

Una condición importante para el desarrollo de la inflorescencia es la buena iluminación de la planta durante todo su crecimiento, pues una carencia originada por competencia con otras plantas (ubicadas a poca distancia) puede inhibir la formación de la inflorescencia.

1.10.3. *Lycopersicon esculentum* (TOMATE)

El tomate o jitomate es una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva como anual, de la familia *Solanaceae*.(101)

De acuerdo con esta investigación, financiada por el Departamento australiano de Salud y publicada en la revista «Maturitas», el licopeno, la sustancia que le da el color rojo brillante al tomate, tiene propiedades antioxidantes que son vitales para una buena salud.(102)

El tomate es una especie de estación cálida razonablemente tolerante al calor y a la sequía y sensible a las heladas. La semilla precisa 20° para germinar y tarda 4 o 5 días, cuando tenga unas 4 hojas y el grosor de una cerilla, la podemos trasplantar.

Aunque se produce en una amplia gama de condiciones de clima y suelo, prospera mejor en climas secos con temperaturas moderadas. La humedad relativa óptima para el desarrollo del tomate varía entre un 60% y un 80%. Humedades relativas muy elevadas favorecen el desarrollo de enfermedades aéreas y el agrietamiento del fruto y dificultan la fecundación, debido a que el polen se compacta, abortando parte de las flores.(103) El rajado del fruto igualmente puede también tener su origen en un exceso de humedad en el suelo o riego abundante a continuación de un período de estrés hídrico. Por otro lado, la humedad relativa demasiado baja dificulta la fijación del polen al estigma de la flor. La planta de tomate necesita un período entre 3 y 4 meses entre su establecimiento y la cosecha del primer fruto. La temperatura media mensual óptima para su desarrollo varía entre 21 y 24°C, aunque se puede producir entre los 18 y 25°C. Cuando la temperatura media mensual sobrepasa los 27°C, las plantas de tomate no prosperan.(104) También este cultivo tiene incidencia de hongo como la Podredumbre gris: Este hongo se manifiesta en la planta de tomate con un micelio blanquecino observable a simple vista. La temperatura de germinación del hongo fluctúa entre 10°C y 30°C, siendo óptimas temperaturas inferiores a 25°C, sobre hojas, tallos y flores se producen manchas pardas (polvo grisáceo) que es el micelio gris del hongo.(105) (106)

1.10.4. *Lactuca sativa* (LECHUGA)

Es un cultivo que se conoce desde hace mucho tiempo, siendo uno de las plantas de cultivo más antiguas, se la conoce como (*Lactuca sativa*), Es una hortaliza típica de ensaladas, considerada como una planta con propiedades tranquilizantes. La lechuga son plantas anuales o bienales. Tiene un alto contenido en vitaminas, lo que la hace que forme parte de muchas dietas.

En general, es un cultivo muy exigente en agua, sobre todo en los períodos de formación del cogollo. Existen variedades para todos los climas; las lechugas acogolladas se adaptan sobre todo a los climas templados y húmedos.(107)

La semilla de la lechuga presenta un periodo de latencia que puede durar hasta dos meses tras la recolección, aunque puede ser roto por diversos factores. La temperatura

óptima de germinación es de 15-20°C y a partir de 25°C se pueden dar fenómenos de latencia por altas temperaturas.(108) Anteriormente se dejó señalado que la lechuga es muy sensible a la sequía, por lo que es de gran importancia proporcionarle agua en cantidad suficiente, tanto más frecuentemente como mayor sea la capacidad de drenaje, es conveniente mantener un buen estado de humedad durante los días de la germinación.(109)

En el cultivo de lechuga se produce micelio veloso que es causado por el hongo como *Botrytis.sp*, *Aerobasidium pullulans* para el control de *Alternaria.sp* y *Trichoderma.sp* para el control de *Fusarium.sp*, *Rhizoctonia.sp* y *Pythium.sp* patógenos produce la mayoría de las lesiones sobre el follaje más viejo, aunque puede infectar cualquier parte de la planta. Las manchas comienzan en forma de áreas amarillentas o verde claro sobre la superficie superior de la hoja; en la cara inferior corresponde a estas manchas un crecimiento de aspecto veloso blanquecino, raras veces el hongo es llevado en la semilla. Este puede vivir varios meses en residuos de cosecha. La diseminación local se produce mediante los esporangios transportados por el viento.(110)

1.10.5. *Raphanus sativus* (RABANITO)

El rabanito pertenece a la familia *Cruciferae* y su nombre científico es el *Raphanus sativus*, es un tipo de hortaliza que forma parte de la familia de las crucíferas junto a las coles y los berros. Se conocen seis especies de rábanos, pero sólo se cultiva el *Raphanus sativus*.(111)

El producto comestible de esta especie es su raíz engrosada de color rojizo, rosa, blanco o combinado, que se consume fresca en ensaladas la que generalmente alcanza su tamaño a cosecha aproximadamente 20 o 30 días después de haber sido sembrado.(112)

Son poco exigentes al tipo de clima y pueden sembrarse durante todas las épocas del año. Pueden cultivarse en clima frío como en cálido, la temperatura favorable para el crecimiento y desarrollo del rábano se encuentra entre los 15 y 18°C con mínimas de

4 y máximas de 21 °C, Se adapta a cualquier tipo de suelo, aunque prefiere los suelos profundos, sueltos, de preferencia arenoso, neutros con un buen drenaje, pero que contenga un alto contenido de materia orgánica y capaz de retener abundante humedad necesaria para el rápido desarrollo del cultivo.(113)

Hay una temperatura mínima (frío) y otra temperatura máxima (calor), dentro de las cuales germina una semilla determinada en condiciones ideales. En el intermedio está la temperatura óptima, o sea aquella temperatura en que una semilla germina mejor y más rápidamente.

Tabla 2. Tiempo de germinación y temperaturas máximas, mínima y óptima para semillas de frijol, brócoli, Tomate, Lechuga, rabanito.(114) (115)

Planta	Días de germinación(aprox)	Temperatura mínima(°C)	Temperatura máxima(°C)	Temperatura óptima(°C)
Frijol	7	10	32	23
Brócoli	6	18	24	23
Tomate	8-10	12	28	23
Lechuga	7	10	26	19
Rabanito	5	10	25	23

La germinación es el reinicio del crecimiento del embrión, paralizado durante las fases finales de la maduración. Los procesos fisiológicos de crecimiento exigen actividades metabólicas aceleradas y la fase inicial de la germinación consiste primariamente en la activación de los procesos por aumentos en la humedad y temperatura optimas de la semilla (Tabla 2).

Las condiciones adecuadas a la que debe ser expuesta la semilla desencadenan una secuencia de cambios metabólicos que incluye la respiración, síntesis proteica y movilización de reservas. A su vez, la división y el alargamiento celular en el embrión provocan la rotura de las cubiertas seminales, que generalmente se produce por la emergencia de la radícula. Sin embargo, las semillas de muchas especies son incapaces de germinar, aun cuando presentan condiciones favorables para ello, lo cual se debe a que las semillas se encuentran en estado de latencia. Por ello, mientras no se

den las condiciones adecuadas para la germinación, la semilla se encontrará en estado latente durante un tiempo variable, dependiendo de la especie, hasta que en un momento dado pierda su capacidad de germinar.(116)

Por tal motivo, son de gran interés científico-técnico los trabajos encaminados a estimular y prolongar la germinación y posterior conservación de las semillas, para poder elevar la productividad de los cultivos de forma sostenible y enfrentar los cambios en el entorno de manera más apropiada.



CAPITULO II

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. Muestras y/o unidades biológicas

- Semillas de cultivo de frijol
- Semillas de trigo
- Semillas de hortalizas (lechuga, tomate, brócoli, rabanito)
- Cepa de *Bacillus.sp*
- Cepa de *Rhizoctonia solani*
- Cepa de *Rhizobium (E-10)*

2.1.2. Material de laboratorio

- Placas de vidrio
- Placas de plástico
- Micro pipetas
- Tips
- Pinzas
- Tubos falcón
- Tubos eppendorf
- Matraces de 50 mL, 100 mL , 250 mL, 500 mL, 1 L, 2 L, 3 L
- Beakers de 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1 L
- Bandejas
- Jeringas
- Papel estéril
- Filtros Millipore estériles 0.22 y 0.28
- Mecheros

2.1.3. Insumos y reactivos químicos

- Caldo de Soya Triptona (TSB),OXOID (*Anexo 1*)
- Caldo Extracto de Levadura Manitol (LMC) (*Anexo1*)
- Agar Extracto de Levadura Manitol (LMA)(*Anexo1*)
- Agar Papa Dextrosa (PDA),OXOID (*Anexo1*)
- Agar de Soya Triptona (TSA),OXOID

- Agar agua MERCK (*Anexo I*)
- Manitol pure (CDH)
- Hipoclorito de sodio 3% (*Anexo I*)
- Alcohol 70% y 90% (*Anexo I*)
- Ácido clorhídrico puro
- Solución salina 0.85%
- Yoduro sublimado
- Rojo Congo

2.1.4. Equipos e instrumentación

- Biorreactor (Applikon)
- Cámara de flujo laminar (biological safety cabinet)
- Cámara climática (labgard class)
- Incubadora (friocell MMM group)
- Estufa (labgard class)
- Espectrofotómetro (Genesys 10S UV vis)
- Centrifuga refrigerada
- Autoclave
- Cámara de 6°C
- Cámara de 28°C
- Horno esterilizador
- Microscopio óptico
- Orbital shaker incubador (MRC)
- Equipo baño maría
- Refrigerador faeda de semillas (14°C)
- Bomba de presión al vacío
- Cubil integrado con Sistema UV

2.1.5. Otros

- Tinglado
- Macetas ½ Kg
- Sustratos
- Tierra agrícola
- Turba
- Arena

2.1.6. Lugar de ejecución

La evaluación del efecto biotecnológico del extracto bacteriano producido por el microorganismo *Bacillus.sp* se realizó en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso”. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Av. La Molina s/n, Lima, Perú

2.2. METODOLOGIA

2.2.1. Presencia de metabolitos con actividad promotora del crecimiento vegetal a nivel *in vitro* y en semillas de interés comercial.

2.2.1.1. Producción de metabolitos del cultivo de *Bacillus.sp* en fermentación batch

2.2.1.1.1. Cultivo de *Bacillus.sp* a nivel de Biorreactor

La cepa utilizada en el presente trabajo corresponde al género *Bacillus.sp* (Figura 3) la cual fue aislada a partir de suelos de la rizósfera de cultivos de frijol al norte del país.

La cepa de *Bacillus.sp* se inoculó en caldo de cultivo TSB (Anexo 1) para la producción de biomasa, en un volumen de 300 mL, el cual se dejó a incubación en el agitador orbital a 28°C por un periodo de 24 horas, finalizado el tiempo, el siguiente paso para obtener el cultivo microbiano, se inoculó al sistema de un biorreactor automatizado de capacidad de volumen de trabajo de 3 L (Figura 4), el volumen del inóculo corresponde al 10% del volumen total del fermentador el cual contiene un medio mínimo mineral, con condiciones adecuadas en los parámetros de pH 7, temperatura 28 °C y agitación 300 rpm.

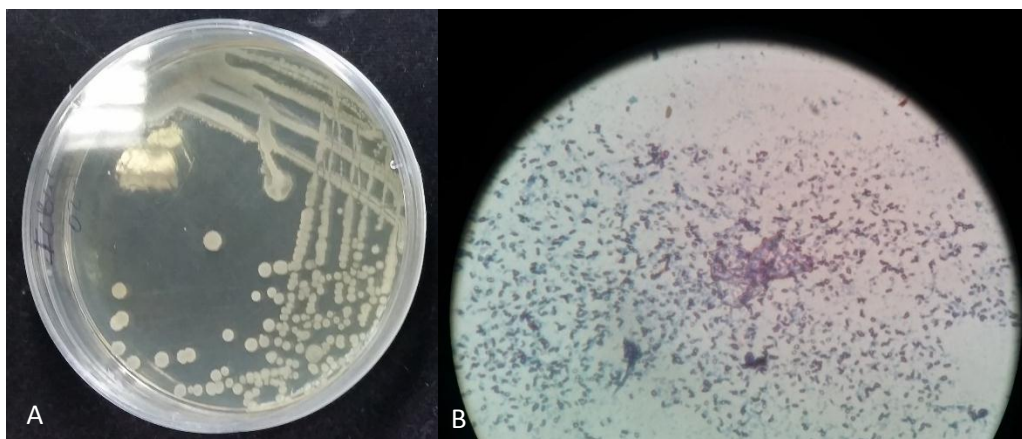


Figura 3. Presentación del microorganismo, A) Cepas de *Bacillus.sp* utilizada, en vista macroscópica B) Cepas de *Bacillus.sp* en vista microscópica.

En la Figura 3 “A” se observa las características macroscópicas de la cepa de *Bacillus.sp*, notando colonias con un aspecto liso, color blanco crema, mucoso y bordes ondulados, formando agrupaciones extendidas sobre el medio. En la Figura 3 “B” se observa características microscópicas a través de la tinción Gram, se observa bacilos Gram positivos, de extremos redondeados, sin deformaciones en los bordes.



Figura 4. Equipo Fermentador de laboratorio Automatizado (APPLIKON) con capacidad de 3 litros utilizado para la fermentación de la cepa.

2.2.1.1.2. Preparación de inóculo

Seguido del proceso de cultivo de *Bacillus.sp* a nivel de Biorreactor, se tomaron diferentes alícuotas de 2 mL en tubos eppendorf de forma periódica con relación al tiempo a partir del momento cero en que se realiza la inoculación y consecutivamente en horas establecidas a las 5, 10, 24, 32, 48, 56 y 72 horas, por cada una de las muestras tomadas se realizó por triplicado, cada una de las muestras fueron procesadas por centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos, del resultado se descarta el precipitado obtenido, separando el sobrenadante, el cual es filtrado con filtros estériles Millipore de 0.22 μm .

2.2.1.2. Prueba de presencia de Ácido indol acético (AIA)

2.2.1.2.1. Curva patrón para Ácido indol acético

La curva patrón se elaboró con dos componentes que denotarían la reacción buscada, el primero con la solución del reactivo Salkowsky compuesto por FeCl_3 , H_2SO_4 y agua destilada (*Anexo 2*), el segundo son las diferentes concentraciones de ácido indol acético, patrones que comprenden concentraciones de 0, 0.25, 0.5, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/mL}$, cada una de las concentraciones se genera por triplicado, para obtener el rango de valores promedio de AIA. (117) Para la reacción frente a la solución del reactivo Salkowsky cada preparación se ve señala en la *Tabla 3*.

Tabla 3. Valores para la preparación de las concentraciones patrón de Acido indol acético.

Concentración [$\mu\text{g/mL}$]	Acido indol acético [μg]	Agua destilada [μL]
0	0	1000
0.25	2.5	997.5
0.5	5	995
2	20	980
5	50	950
10	100	900
15	150	850
20	200	800
30	300	700
40	400	600
50	500	500

Una vez preparados los patrones teniendo un volumen final de 1 mL se adiciona 1mL del reactivo Salkowsky utilizando en proporción 1:1, se agito la solución y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos, finalizado el reposo se hace lectura al espectrofotómetro (Génesis 10S UV vis) (Figura 5) a 530 nm, utilizando como blanco el mismo volumen agua destilada sin adición de AIA. Con los resultados de absorbancia de cada patrón se construyó la gráfica de absorbancia vs. concentración, calculando la ecuación de la recta y valor de r^2 , se calculó el promedio de las repeticiones para obtener la regresión lineal mediante la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación lineal que debe ser mayor a 0.9 por lo que se considera así una correlación ideal entre los datos.

2.2.1.2.2. Determinación de concentración de producción de AIA

Se realizó la determinación de la producción de ácido indol acético, a partir del muestreo realizado durante el proceso de fermentación de la cepa en el tiempo descrito por el paso anterior de preparación de inóculo, con el uso del reactivo de Salkowsky con formulación de H_2SO_4 7.9M y $FeCl_3$ 40 mM. Se toma 1 mL del inóculo y se agrega para la reacción 1 mL del reactivo Salkowsky, el proceso se realiza por duplicado, se deja en reposo a temperatura ambiente por 30 minutos para luego leer en el espectrofotómetro a 530 nm determinando el valor de absorbancia con su valor promedio. Una vez obtenidos estos valores, se sustituyen en la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva patrón de AIA, forma mediante la cual se determina la concentración de AIA ($\mu\text{g/mL}$) producida en la fermentación de la cepa de *Bacillus.sp* por un periodo de 72 horas. Se utilizó como control positivo la cepa E-10 inoculada en medio de LMC (*Anexo 1*).



Figura 5. Espectrofotómetro utilizado para la cuantificación colorimétrica

2.2.1.3.Prueba de Solubilización de Fosfatos

Se tomó 100 µL de cada muestra mencionada en el paso de preparación de inóculo del proceso de fermentación de la cepa de *Bacillus.sp.*, y se sembraron en medio NBRIP (National Botanical Research Institute Phosphate) modificado con Fosfato tricálcico ($3Ca_3(PO_4)_2$) (Anexo 2). Se utilizó de control positivo la cepa de *Pseudomona TvPs 01.3*, las placas se incuban a 28°C por 24 a 72 horas. La aparición de halos claros alrededor en el medio NBRIP es usado como indicadores presuntivos de solubilización de fosfatos(118). Se realiza la evaluación diaria por 4 días la presencia de los halos transparentes así como su tamaño de formación. Se reportara la eficiencia de la solubilización (SE) de acuerdo a la técnica utilizada por Nguyen et al.(119):

$$SE = (DS/DC) \times 100$$

Dónde:

SE: Eficiencia de solubilización.

DS: Diámetro de solubilización

DC: Diámetro del pozo.

2.2.1.4.Prueba de presencia de Sideróforos

La producción de sideróforos se determinó cualitativamente utilizando el medio CAS (Anexo 1). En este medio el hierro se encuentra formando un complejo estable con el Chrome Azurol S (CAS) y el HDTMA (Bromuro Hexadeciltrimetil Amonio)(120), siendo este complejo el responsable del color azul del medio. Cuando un quelador fuerte, en este caso los sideróforos, capturan el hierro del complejo este pierde su color azul y se torna naranja. Este cambio de color es usado como variable de respuesta en los microorganismos productores de sideróforos (121) y Para este procedimiento, se

utiliza de cada uno de los tiempos muestreados del fermentado de *Bacillus.sp* ya procesados bajo el procedimiento anterior de preparación de inóculo, se tomó 100 μL para adicionar a los pozos de agar CAS luego deben ser incubados a 28°C por 4 días con revisión periódica. En el ensayo los halos naranja que probablemente se formen alrededor del pozo se miden en mm. (122)

2.2.1.5. Germinación de semillas a nivel *in vitro*

2.2.1.5.1. Preparación de los productos metabólicos obtenidos a partir del cultivo de *Bacillus.sp* a nivel de biorreactor

Los productos metabólicos fueron obtenidos a partir de la inoculación de la cepa bacteriana *Bacillus.sp* a un cultivo en sistema *batch* en biorreactor, descrito en el punto 2.2.1.1.1 con un medio mínimo mineral formulado con anterioridad adecuado para la producción de metabolitos. Una vez finalizado el proceso de fermentación, la cosecha que se obtiene se utiliza de manera fraccionada, es decir, los tratamientos a los que se inocula en las semillas para evaluar sus efectos, será el fermentado total siendo el primer tratamiento (I) (Fer), la otra parte será llevada a centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos en tubos falcón de 50 mL. Aquí se muestra dos fases a separar, la biomasa que también será usada como uno de los tratamientos (II) (Bm), y el sobrenadante de igual manera como tratamiento al colectarlo como metabolito en crudo libre de células (III) (Met), el cuarto tratamiento como control positivo será la cepa de *Rhizobium Etli* E-10 (IV) en medio líquido LMC y como control negativo solo se utilizara agua destilada (V) (C^-). Obteniendo finalmente fermentado (Fer), Biomasa (Bm), metabolitos (Met), control positivo *Rhizobium Etli* (E-10), Control negativo agua destilada (C^-) (Figura 6).

2.2.1.5.2. Desinfestación de semillas

Las semillas (frijol, lechuga, tomate, rabanito y brócoli) previamente seleccionadas de acuerdo a su tamaño, forma, color, textura y libres de daños posibles producidos por insectos, serán desinfestadas en alcohol al 70 % durante 1 minuto; posteriormente, serán embebidas en lejía al 3 % durante 1 minuto. Finalmente, se eliminará los restos de los desinfectantes lavando las semillas en agua destilada estéril por 3 veces, para concluir se deja secar por un tiempo de 20 min eliminando así los restos de líquido en toda la superficie.

2.2.1.5.3. Inoculación de semillas

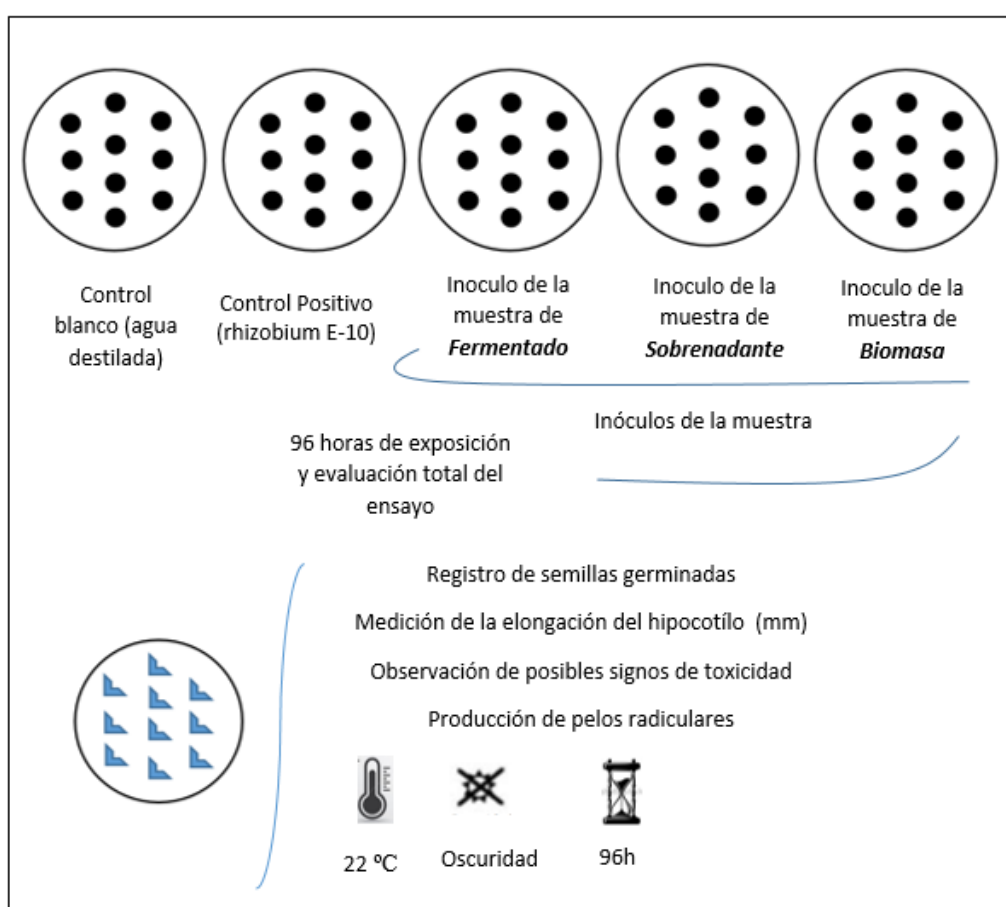
La inoculación se realizó de manera uniforme, sumergiendo las 30 semillas de cada una de ellas (frijol, lechuga, tomate, rabanito y brócoli), en 20 mL de los inóculos de cada tratamiento preparados, durante media hora. Las semillas con el tratamiento de control negativo o testigo se sumergirán en agua destilada estéril durante el mismo tiempo. Luego de ser retiradas y secadas en soporte de papel toalla estéril en cámara de flujo, las semillas inoculadas serán colocadas en placas con Agar Agua semisólido. Cada tratamiento consistirá con 3 repeticiones con 10 semillas por repetición. Finalmente son llevadas en condiciones adecuadas para la germinación tal como temperatura, calidad de luz, por un tiempo total de 96 horas como se muestra en la *Tabla 4*. Se evaluará el porcentaje de germinación, crecimiento de hipocótilo y pelos radiculares. La medición se realizará 2 veces al día, a partir de las 24 horas durante 4 días. (*Figura 6*)

Tabla 4. Condiciones recomendadas para la prueba de efecto metabólico de los extractos de la fermentación de *Bacillus.sp* en germinación de semillas in vitro.

Temperatura	22°C
Calidad de luz	Oscuridad

Volumen del medio Agar Agar	10 mL
Numero de Semillas por replica	10
Numero de replicas	3
Duración de la prueba	96 Horas
Efecto de medida	Elongación del hipocótilo, porcentaje de germinación, cantidad de pelos radiculares

Figura 6. Esquema general del procedimiento de la prueba de efecto metabólico en germinación para cada tipo de semillas y sus tratamientos, (fuente propia).



2.2.2. Determinación de la presencia de enzimas hidrolíticas y metabolitos con actividad antifúngica a partir del cultivo de *Bacillus.sp* en fermentación batch a nivel de biorreactor

Para esta evaluación se repite dos procesos descritos con anterioridad para la cepa de *Bacillus.sp*, tanto la etapa de cultivo en Biorreactor y preparación de inóculos, este último consiste en tomar muestras de 2 mL en tubos eppendorf de forma periódica con relación al tiempo a partir del momento cero en que se realiza la inoculación y consecutivamente en horas establecidas en las 5, 10, 24, 32, 48, 56 y 72 horas, cada una de las muestras fueron procesadas por centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos, del resultado se descarta el precipitado obtenido, separando el sobrenadante, para una mayor pureza y esterilidad de partículas suspendidas del inóculo se lleva a cabo el proceso de filtrado con filtros estériles Millipore de 0.22 μm , cada una de la toma muestras por triplicado.

2.2.2.1. Prueba de presencia de celulasas

Se tomó 100 μL de cada toma de muestra a lo largo del tiempo de proceso de fermentado de *Bacillus.sp* y se inoculan en placas con agar nutritivo suplementado con Carboximetilcelulosa (CMC), 1% (p/v). Este medio está compuesto de 1.0% de CMC, extracto de levadura 0.25%, peptona 0.25%, Sulfato de amonio 0.05%, Cloruro de calcio 0.05%, Fosfato de potasio monobásico 0.01%, Fosfato de potasio di básico 0.01% y agar 1.5%; el pH del medio a 7.0 y se incubó a 28°C durante 48 horas. Tras la incubación, se reveló la degradación del CMC, cubriendo el medio con solución de rojo de Congo 1.0% (p/v). Luego se lava con Cloruro sódico 2 mol/L, dejando por 5 minutos bajo reposo. Después, la actividad celulósica se determinó por la presencia de áreas de halo expresadas por la hidrólisis de la celulosa cuyo diámetro debe ser medido en mm. (123)

2.2.2.2. Prueba de presencia de proteasas

La producción de proteasa se verá utilizando leche desnatada y caseína como fuentes de carbono de las cepas. El medio de cultivo está compuesto de 9 g/L de caseína peptona, 9 g/L de extracto de levadura, 9 g/L de leche descremada y 14 g/L de agar, con pH del medio 7. Depositando en los pozos de agar leche 100 uL de los inóculos de muestra tomados, las placas se mantendrán en incubación a 28°C durante una semana. La producción de proteasa estará determinada por la presencia de un halo transparente alrededor de los pozos. (124) El instrumento utilizado para las medidas de halo es un Vernier digital.

2.2.2.3. Prueba de presencia de Amilasas

La actividad de las amilasas se evaluó mediante el procedimiento en placa, colocando 100 uL de los inóculos en un medio de producción compuesto de extracto de carne 3 g/L, almidón 10 g/L y agar 15 g/L, con pH del medio a 7, finalmente incubar a 28°C durante 48 horas y revisar. Después de la incubación, la actividad de amilasas se revelara con yodo sublimado y se determina por la presencia de áreas de halo expresadas por hidrólisis del almidón cuyo diámetro se midió en mm (FDA 2001).

2.2.2.4. Prueba de presencia de Quitinasas

2.2.2.4.1. Preparación Agar Quitina Coloidal

Se coloca el sobrenadante del fermentado obtenido en los pozos de placas con Agar Quitina Coloidal a pH 7, luego se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, a 4 días, concluido tiempo se miden los halos de aclaramiento alrededor de la zona de sembrado como indicadores de la presencia de quitinasas. (124) (125)

2.2.2.4.2. Pretratamiento de quitina coloidal (QC)

Este proceso fue llevado a cabo por Hsu y Lockwood (113), donde menciona que se requiere darle un previo tratamiento a la quitina granulada para que pueda ser utilizada en la preparación de un medio de cultivo. Da inicio con disolver 20 g de quitina en 400 mL de *HCl* concentrado manteniendo en agitación constante por 50 minutos, después del tiempo se añade 2 litros de agua destilada fría esta mezcla fue dejada en agitación constante por 12 horas a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se filtra al vacío quedando con el precipitado para realizar lavados con agua destilada, esto elimina el ácido, la pasta restante de consistencia cremosa a gelatinosa se esterilizo durante 15 minutos en autoclave, para luego ser almacenada a 4°C hasta su uso.(126)

2.2.2.5. Prueba de cuantificación de Proteínas totales

Se realizó la cuantificación de proteínas totales siguiendo el método descrito por Bradford(127), para lo que es requerido preparar una curva patrón, usando seroalbumina bovina que indicara una concentración conocida.

2.2.2.5.1. Curva Patrón de Albumina

Se disolvió 10 mg de albumina bovina en 10 mL de agua destilada, teniendo una solución madre con concentración de 1 mg/mL, para luego preparar una batería de tubos con concentraciones conocidas con un rango de entre 1 hasta 70 ug/mL de concentración de proteínas con su volumen correspondiente de agua destilada, de acuerdo con la siguiente de valores (*Tabla 5*).

Tabla 5. Valores para la preparación de las concentraciones patrón para la evaluación de proteínas totales.

Concentración (ug/mL)	0	1	2	5	10	15	20	30	40	50	60	70
ul(albumina)	0	1	2	5	10	15	20	30	40	50	60	70
ul(agua)	1000	999	998	995	990	985	980	970	960	950	940	930
ul(total)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Finalmente agregar 3 mL del reactivo Bradford tanto a los tubos de albumina como de igual forma se procede a realizar este último paso a otra batería que contiene el sobrenadante de cada muestra del cultivo tomado desde las 0 hasta las 72 horas del muestreo realizado al fermentado de *Bacillus.sp*, después de concluido el reposo de 30 minutos se hace lectura al espectrofotómetro (génesis 10s Uv vis) (Figura 5) a una longitud de onda de 595 nm, utilizando como blanco agua destilada con el reactivo, con los resultados, teniendo dos repeticiones se calculó el promedió que se registraron en data para la gráfica de absorbancia vs. concentración, calculando la ecuación de la recta y valor de R^2 , para obtener la regresión lineal mediante la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación lineal que debe ser mayor a 0.9 por lo que se considera así una correlación ideal entre los datos. En la ecuación obtenida se remplazan los valores obtenidos en la batería de muestreo del fermentado de *Bacillus.sp* en cuestión, lo que da los valores de proteínas totales contenidas en el extracto.

2.2.2.6. Actividad Antagonista de Biocontrol

2.2.2.6.1. Microorganismo

Para la prueba de antagonismo se utilizó un aislado del patógeno *Rhizoctonia solani* cepa que fue proporcionada por el laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología de la UNALM, Se seleccionó un aislado por la capacidad de infectar a las raíces y tallos de plántulas de frijol de variedad canario.

2.2.2.6.2. Bioensayo

Para realizar las pruebas de antagonismo *in vitro* se utilizó el método de excavación en placa según Mitidieri, 1998 (47), en placas con medio PDA. Se hizo 3 perforaciones de 5 mm a una misma distancias de 3 cm, en las perforación, se coloca con micropipeta, 120 µL del metabolito activo extraído y en medio de la placa el micelio del hongo Fito patógeno con 2 días de crecimiento (*Rhizoctonia solani*). El mismo procedimiento se debe llevar para el control negativo de la prueba con agua destilada estéril. Finalmente, se determina el porcentaje de inhibición producido por el extracto de metabolitos activos de las cepa de *Bacillus.sp* utilizando la siguiente fórmula: $(R1 - R2)/R1 \times 100$ según Whipps 1987 (48), donde R1 corresponde a la distancia de crecimiento del hongo en dirección a la bacteria antagonista y R2 la distancia entre el hongo y la bacteria (zona de inhibición).

2.2.3. Efecto de la actividad de metabolitos en conservación con promotores de crecimiento vegetal y acción antifúngica a nivel de invernadero

2.2.3.1. Preparación de los metabolitos con actividad antifúngica bajo diferentes métodos de conservación

Se obtuvieron a partir de la cepa bacteriana *Bacillus.sp* inoculada a un cultivo en sistema de biorreactor con un medio mínimo mineral adecuado para la producción de metabolitos. Una vez que se realizó la cosecha se utiliza por separado dos partes del cultivo, una cantidad de fermentado total (A), la otra parte fue llevada a centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos en tubos falcón de 50 mL. Aquí se obtuvo dos fases al separar la biomasa y el sobrenadante, este último al ser colectado como metabolito crudo es el segundo tratamiento (B). Ambos fueron separados en 4 partes de 250 mL, y cada uno sometidos a diferentes temperaturas de enfriamiento de (Temperatura ambiente, 4°C, -20°C y por el método de liofilización), por un mes.

2.2.3.2. Parámetros utilizados para el proceso de liofilizado

Para el proceso de liofilizado llevado a cabo tanto para el fermentado como para el sobrenadante se utilizó el Equipo Liofilizador Marca LABCONCO modelo FreeZone Triad.

ETAPAS DEL PROCESO

- *Congelación inicial (-80°C)
- *Sublimación o desecación primaria. (-25)
- *Desorción o desecación secundaria. (0)

PARAMETROS

- *Presión: (0.200 mbar) (20 pa)
- *Tiempo de cada etapa: 5h y 2h respectivamente
- *Tiempo total de liofilización: 7h

2.2.3.3. Germinación de semillas de frijol

Las semillas de frijol previamente desinfectadas con el tratamiento de alcohol e hipoclorito de sodio se colocaron en placas con Agar Agua semisólido a incubación en la cámara climática a 22°C por 3 días.

2.2.3.4. Instalación del ensayo a nivel de tinglado

2.2.3.4.1. Preparación de sustrato en maceta

Se instaló un sistema de macetas de manera ordenada (*Figura 7*) con volumen de capacidad de 500 g previamente esterilizadas con luz UV, el sustrato para la siembra contiene una mezcla de tierra agrícola, arena y turba en la proporción 2:1:1 (p:p). Los sustratos fueron uniformizados y esterilizados por vapor durante 1 hora cada 24 horas por tres veces continuas. En cada maceta se coloca 2 semillas de frijol con una distancia 5cm entre ellas y a una profundidad de 3 cm.

2.2.3.4.2. Inoculación de semillas

Las semillas fueron introducidas en maceta con sustrato, cada una de ellas fue inoculada con 1 mL correspondiente de los diferentes inóculos sometidos a temperaturas de congelación por las 3 diferentes temperaturas establecidas, previo a esto el método de liofilizado requirió de una re suspensión en 250 mL agua destilada para su activación e incorporación a las semillas de frijol correspondientes. Así también se inóculo 1 mL del control positivo de la cepas de *Rhizobium* (E-10) la cual se sembró en medio LMC.



Figura 7. Vista del sistema instalado en maceta, como soporte para la inoculación en planta de los tratamientos del fermentado bacteriano con actividad de PGP y como biocontrol.

2.2.3.4.3. Soporte para hongo patógeno *Rhizoctonia solani*

Se utilizó semillas de trigo como sustrato para el crecimiento e incorporación de infección a las plantas en maceta con el hongo patógeno.

Se trataron las semillas de trigo incorporando agua en el doble de su volumen en un beaker para realizar su hidratación se mantuvo al microondas por 10 minutos desde hervor, luego de esto se decantó el agua y se esparce en una bandeja estéril para el secado, una vez listos se separa en porciones más pequeñas en bolsas amarradas dejando un volumen dentro de oxígeno, finalmente se ingresa al autoclave, dos veces por 15 minutos a 121°C y a 15 Psi de presión. Procediendo con la inoculación dentro de las porciones de trigo se sembró 10 discos de agar con el micelio del hongo ya crecido, para su propagación se incubación a 28°C durante 5 días.

La inoculación del patógeno se da con la siembra de las semillas de trigo infectadas, a un costado de cada semilla de frijol a una distancia de 3 cm de suelo (*Figura 8*), en esta imagen se tiene la vista interna y externa de cómo se da la infección en el cuello y raíz de la planta de frijol. La inoculación del hongo patógeno en soporte de semillas de trigo es el a los 15 días del sembrado de las semillas de frijol.

La técnica brinda la obtención del hongo en un soporte apropiado para plantar en maceta, micelio que se aproxima a la infección en condiciones adecuadas ya que el hongo cuando se encuentra mucho tiempo en placa se domestica es decir tiende a bajar su virulencia, el micelio inoculado en las semillas de trigo proviene de una infección directa de planta, siendo una proliferación más agresiva.



Figura 8. A) Infección del hongo *Rhizoctonia solani* en planta de frijol, B) pudrición en el cuello del tallo y raíz, C) corte longitudinal, apreciación de muerte del tejido, D) deterioro y pudrición del tallo de la planta.

2.2.3.4.4. Diseño experimental

El ensayo se instaló a nivel de invernadero utilizando un diseño completamente al azar con 7 repeticiones por cada tratamiento y 2 plantas por maceta. Los tratamientos consistirán en diferentes estados del metabolito bajo un sistema conservación de congelado a 4°C, -20°C, temperatura ambiente y el método de liofilizado, control positivo E-10 para acción PGP, inoculación de solo patógeno, control testigo (solo planta) y el control químico (HOMAI). (Tabla 6)

Tabla 6. Distribución de tratamientos para el ensayo en plantas de frijol en invernadero.

TRATAMIENTOS	
TRATAMIENTO I Fermentado	Temperatura ambiente
	4°C
	-20°C
	Liofilizado
TRATAMIENTO II Sobrenadante	Temperatura ambiente
	4°C
	-20°C
	Liofilizado
TRATAMIENTO III	Control(+),Cepa Rhizobium E-10
TRATAMIENTO IV	Testigo, Agua
TRATAMIENTO V	Control químico (HOMAI).
TRATAMIENTO VI	Control Patógeno

2.2.3.4.5. Medición y Evaluación de parámetros agronómicos

La medición de parámetros agronómicos es una tarea importante debido a que estos individuos serán una referencia para logra dar gestión de la productividad en un proceso desde la selección de la variedad hasta el final de la etapa productiva de la plantación, es importante generar parámetros de crecimiento obtenidos en base a mediciones vegetativas que permitan generar criterios técnicos para maximizar los recursos a través del tiempo. Esto abre oportunidades para desarrollar diferentes metodologías para una buena gestión de la productividad.

a) Altura de planta (cm)

Será evaluada la longitud desde el cuello de la planta hasta el ápice.

b) Peso seco y fresco de la parte aérea (g)

Se pesará el tallo y las hojas en estado fresco y seco.

c) Numero de botones florales

Se contabilizará el número de brotes en floración de las plantas de cada tratamiento

d) Largo de la raíz

Sera medida desde la parte superior del cuello de la plata (cm)

e) Peso fresco y seco de raíz por planta

Se pesará en estado fresco y seco de cada raíz.

f) Peso fresco y seco de nódulos de cada raíz

Se pesará en estado fresco y seco los nódulos de cada raíz.

2.2.3.4.6. Evaluación de la incidencia de la enfermedad

Se determina por características macroscópicas a una escala de mínimo grado en la que 1= planta sana y 9 = planta con la máxima severidad.

La escala permite determinar el grado de severidad del ataque del hongo patógeno en la raíz del cultivo de frijol, la cual fue usada por Pastor-Corrales en el libro sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol.(128)

Tabla 7. Escala para evaluación de grado de severidad de incidencia del hongo en la raíz del cultivo de frijol.

Grado de Severidad	Apariencia del daño
1	Sin síntomas visibles de la enfermedad.
3	Decoloración ligera, sin lesiones necróticas o con 10% de los tejidos del hipocótilo y de la raíz cubiertos con lesiones
5	Aproximadamente 25% de los tejidos del hipocótilo y de la raíz están cubiertos con lesiones, con decoloración fuerte, aunque los tejidos estén firmes.
7	Aproximadamente 50% de los tejidos del hipocótilo y de la raíz están cubiertos con lesiones que se combinan con ablandamiento, pudrición y reducción considerable del sistema radical.
9	Aproximadamente 75% o más de los tejidos del hipocótilo y de la raíz están afectados por estados avanzados de pudrición, en combinación con una reducción severa del sistema radical.

La incidencia de las pudriciones de raíz se calculó con la fórmula de Van der Plank en Principles of Plant Infection(129) :

$$I = PE / PT \times 100$$

Donde, I = índice de incidencia (%), PE= número de plantas afectadas, PT= número total de plantas.

2.2.3.4.7. Análisis de datos

Se empleará un Diseño Completamente al azar realizando un Análisis de Variancia (Anova) y Tukey ($p < 0.05$), para comparar tratamientos, será utilizado el programa Statgraphics.

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Presencia de metabolitos con actividad promotora del crecimiento vegetal a nivel *in vitro* y en semillas de interés.

3.1.1. Curva patrón de Acido indol acético

En la curva patrón para ácido indol acético con el reactivo Salkowsky, se obtuvo las absorbancias de cada concentración medida, las cuales están indicadas en la *Tabla 8*, necesarias para establecer las cantidades de AIA presente como datos preliminares, con estos resultados se elaboró la curva de calibración mostrada en *Figura 9*, para determinar la ecuación de la recta y el valor de R^2 , confirmando que los valores de la pendiente se encuentran estandarizados para la detección adecuada de AIA.

Tabla 8. Absorbancias promedio de las muestras para generar la Curva patrón de Acido indol acético.

Concentración ug/mL	Absorbancias Obtenidas
0	0
0.25	0.023
0.5	0.034
2	0.072
5	0.117
10	0.208
15	0.291
20	0.366
30	0.527
40	0.682
50	0.832

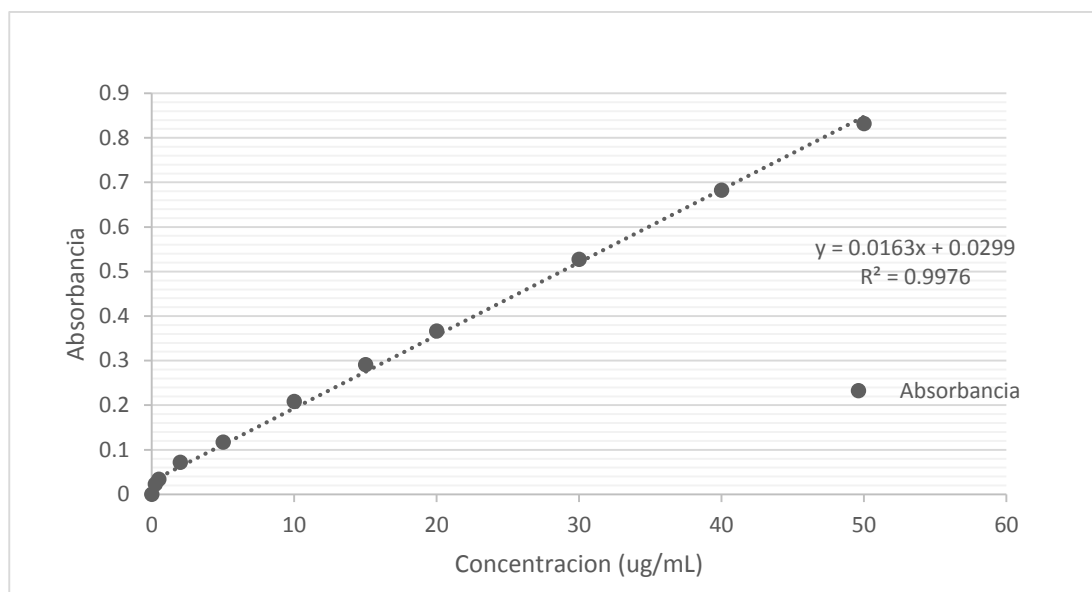


Figura 9. Curva de calibración del reactivo Salkowsky.

La curva de calibración presenta comportamiento lineal ascendente por la reacción con el reactivo frente a la concentración de AIA, por medio de su color fucsia característico, muestra una medida creciente de la concentración directamente proporcional a la cantidad que contiene, debido a esto se generó la ecuación de la recta y $R^2 = 0.9976$. Una vez conformados los datos se utilizó dicha ecuación para cuantificar AIA presente por la cepa, a partir de los datos obtenidos por absorbancia de las muestras en reacción con el reactivo Salkowsky.

3.1.2. Detección colorimétrica de extractos obtenidos

La concentración de AIA fue cuantificada por medio de la reacción colorimétrica que resulta en reacción con el reactivo de Salkowsky. El AIA y sus precursores se caracterizan por generar un color rojizo al entrar en contacto con dicho reactivo, donde la intensidad de la coloración de la reacción es directamente proporcional a la cantidad presente de AIA. Cuando se pone en reacción una muestra y se torna de color amarillo a café se podría especular la detección de otros compuestos de grupo indol como ácido indol butírico, ácido indol pirúvico o ácido indol propiónico, al ver los colores fucsia generados se descarta la presencia de estos posibles.

La aparición de color cada vez más intenso se debe a una reacción oxidativa causada por el ácido y una transaminación que lleva a la sustitución del grupo amino por el Cl del $FeCl_3$, presente en el reactivo de Salkowsky.

De acuerdo a estos resultados se observa que hay una relación creciente de la cantidad de producción de AIA con respecto al tiempo (*Figura 10*). La concentración de AIA en cada inóculo se determinó al realizar una comparación con la curva patrón reemplazando los valores de absorbancia obtenidos (*Tabla 9*), en la ecuación obtenida en la regresión lineal mediante la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación lineal en la *Figura 9*, obteniendo la concentración de AIA por parte del género *Bacillus.sp* pero sin embargo este presenta una producción menor al control que alcanzo la cantidad de 116.63 ug/mL.

Se observó en aquellas tomas positivas un color rosado cuya intensidad varía en función de la concentración de AIA presente en el sobrenadante.

Tabla 9. Absorbancia de las 8 muestras de sobrenadante de diferentes tiempos de fermentación bacteriana de *Bacillus.sp*.

Muestras / h	Absorbancias obtenidas	Concentración ug/mL
0	0.03	0.006
5	0.051	1.294
10	0.063	2.030
24	0.207	10.865
36	0.235	12.582
48	0.349	19.576
56	0.493	28.411
72	0.623	36.386
Control +	1.931	116.631

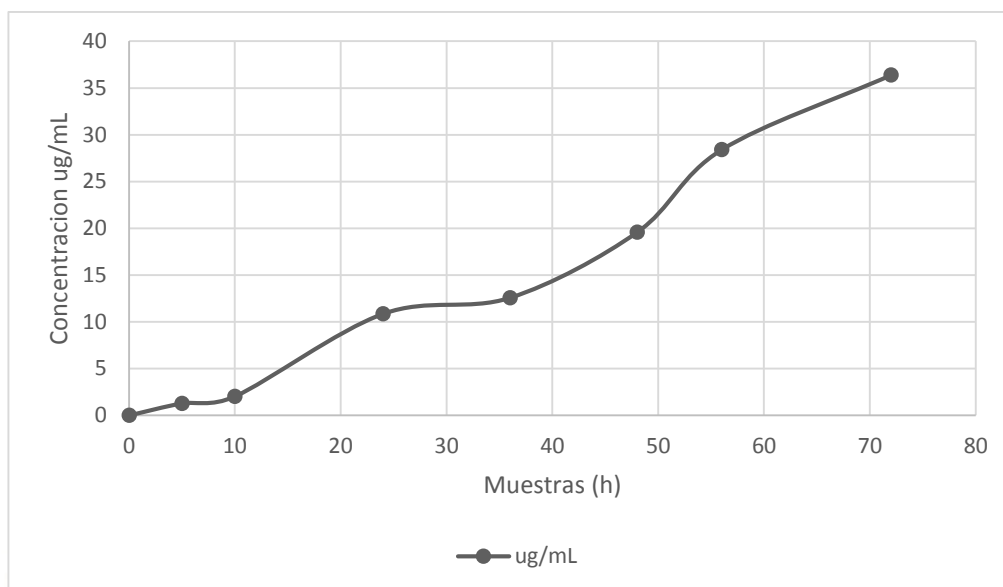


Figura 10. Curva de producción de Acido indol acético

Las muestras tomadas para la lectura de AIA muestran una diferencia de intensidad de coloración que indica distintas concentraciones de manera creciente en relación a su evaluación en el tiempo (Figura 11).

Se observó que la cepa de *Bacillus.ps* presentó una concentración de ácido indol acético con una concentración final de 36.38 $\mu\text{g/mL}$ a las 72 horas, este resultado es significativamente menor respecto al control positivo utilizado *Rhizobium* E-10, el cual alcanzó una producción de 116.63 $\mu\text{g/mL}$.

La concentración de ácido indol acético por parte del género *Bacillus.sp* se ha visto generalmente alta, se han reportado cantidades de producción de 57.9 y 47.3 $\mu\text{g/mL}$ por algunas otras cepas de *Bacillus.sp* como en el estudio de Gutiérrez et al. The influence of native rhizobacteria on european alder growth (130), de manera que la concentración de ácido indol acetico producida por la cepa, podría considerarse como baja, teniendo en cuenta que se han reportado producciones de más de 55 $\mu\text{g/mL}$ por parte de este género.

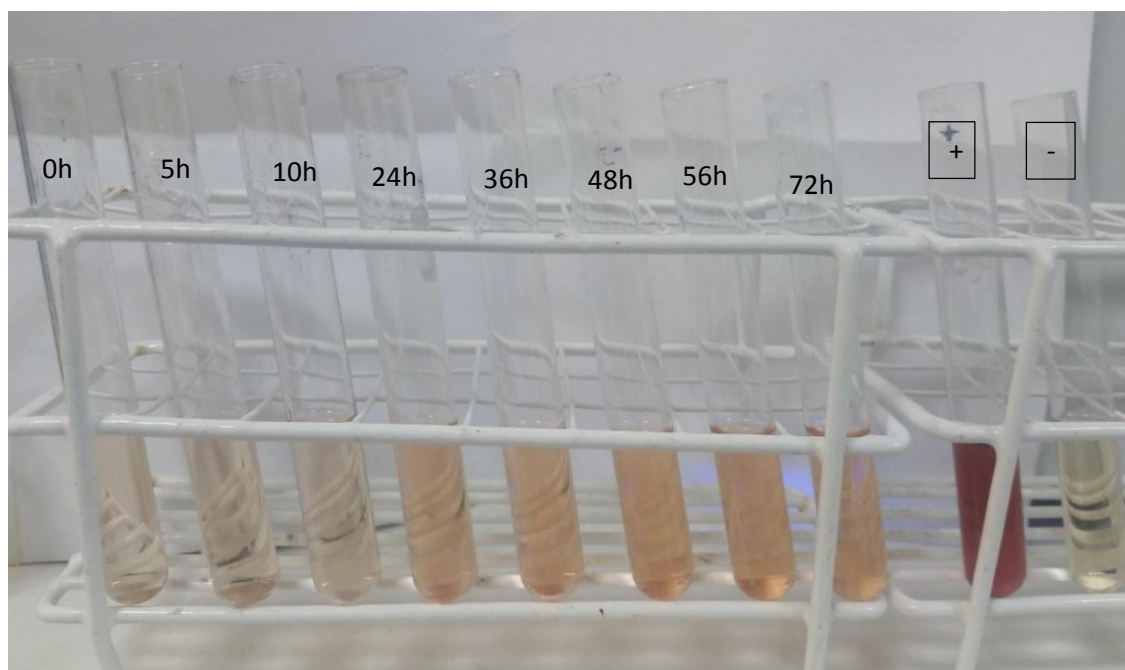


Figura 11. Evaluación de Acido indol acético en el sobrenadante del fermentado de *Bacillus.sp* por las tomas de muestreo durante las 72 horas.

En la *Figura 11* se ve representado el resultado de las muestras en evaluación, se observa la tonalidad de la coloración obtenida por la reacción que es directamente proporcional a la cantidad de AIA. De esta manera, cuando se obtiene un color fucsia a púrpura intenso es un indicativo de la presencia de altas cantidades de AIA en la muestra; por otro lado, si se torna de un color fucsia a rosa pálido se asume la presencia de una baja concentración de AIA.

3.1.3. Solubilización de fosfatos

En este experimento la solubilización de fosfato inorgánico se puso de manifiesto por la formación de un halo transparente en el medio NBRIP para el inóculo sobrenadante, se observa alrededor del inóculo una zona clara, que evidencia la solubilización de fosfatos. Este cambio de coloración ocurrió alrededor de los pozos del medio de cultivo. Varios estudios han puesto en evidencia la capacidad solubilización de fosfatos por diferentes especies microbianas. Entre las bacterias destacan el género *Bacillus.sp* (131).

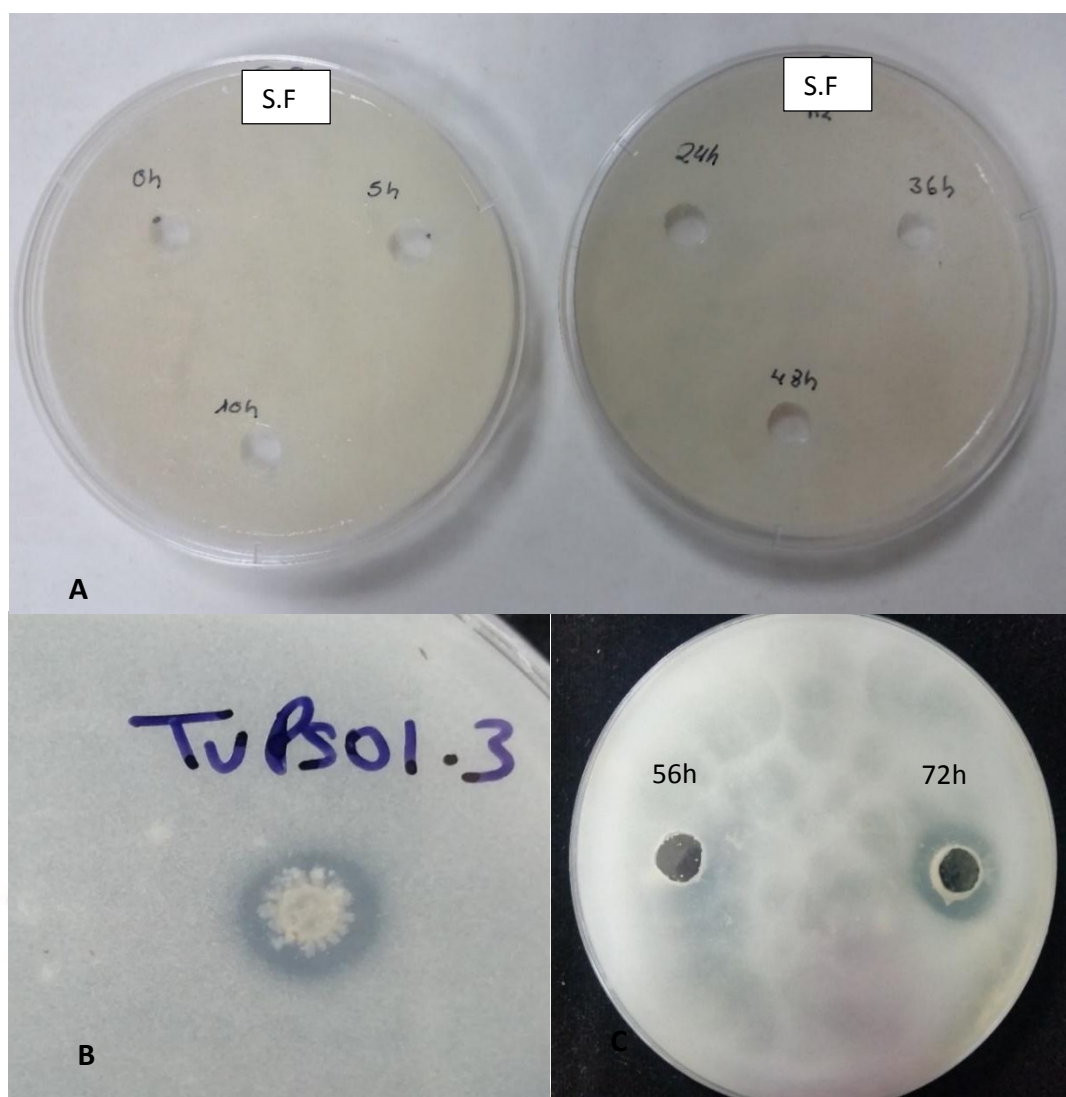


Figura 12. Evaluación de solubilización de fosfatos en medio NBRIP por el sobrenadante del fermentado de *Bacillus*.sp.

En la *Figura 12 "A"* Se observa después de 48 h de incubación las placas de muestras de 0 a 48 horas de los que se obtiene un resultado negativo, *Figura 12 "B"* Placa de cultivo con la cepa *TvPs 01.3* microorganismo presente como control positivo, *Figura 12 "C"* inóculo de 56 h resultado negativo (-), resultado positivo obtenido con el inóculo a las 72 h de muestreo.

3.1.3.1. Eficiencia de la solubilización (SE):

Considerando lo importante del tamaño de los halos de solubilización que se forman en torno a los pozos de los inóculos. Se realizó mediante el cálculo del índice de

solubilización, el cual consiste en dividir el valor del diámetro total del halo entre el diámetro del pozo, y finalmente este resultado por cien.

Bajo este método, se presume que las muestras con los mayores valores del índice son las más eficientes. Este índice indica el radio de acción del inoculo sobre el sustrato, expresado en porcentaje.

$$SE = (DS/DC) \times 100$$

Dónde:

SE: Eficiencia de solubilización.

DS: Diámetro de solubilización

DC: Diámetro del pozo.

$$SE = (13\text{ mm}/7\text{ mm}) \times 100$$

$$SE = 185.7\%$$

El resultado porcentual muestra la actividad de solubilización frente el fosfato tricálcico desde el segundo día después de su inoculación, cuando se observó la formación de halos alrededor de la colonia en las placas de agar (*Figura 12*). La SE del sobrenadante en el sustrato con Fosfato tricálcico fue de 0% hasta las 56 horas de toma de muestra, sin embargo el máximo valor de este índice se presentó en el día 3 a 72 horas con 185.7 %. Estos resultados indican que el área de solubilización fue aproximadamente casi el doble de veces más extensa que el tamaño del área de contenido. El valor reportado es considerable al compararlo a los valores reportados por *M. E. Beltrán Pineda* (132), quien evaluó bacterias con actividad de solubilización de fosfato en suelo de páramo cultivado con papa, las que presentan entre el 142.8% y el 205% de eficiencia. Por otro lado en la investigación de Hernández-Leal et al con solubilización *in vitro* de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (41) en comparación con más cepas bacterianas reportan de 206% a 306% con tamaños de halo desde 18.41 y 47.77 mm respectivamente.

Por otro lado, la respuesta dada de solubilización frente al Fosfato de tricálcico ($3Ca_3(PO_4)_2$) resulta ser favorable ya que este elemento se encuentra en un punto de menor solubilidad, mayormente encontrado en suelos neutros y alcalinos, en comparación con el Fosfato de hierro ($FePO_4$) considerado de igual manera de menor solubilidad y el Fosfato de aluminio ($AlPO_4$) que se encuentran presentes en suelos ácidos, complejos poco solubles debido a la unión a los aniones fosfato con los otros elementos.

Por el cual que la solubilización de fosfatos también depende del tipo de microorganismo en actividad y el tipo de fosfato insoluble utilizado(133), buscando lograr liberar el ion fosfato accesible para la planta.

Este elemento se encuentra limitado en el suelo y es un nutriente vital después del nitrógeno para el desarrollo de la planta. El género *Bacillus* se ha destacado como un potencial solubilizador de fosfato y puede ser utilizado como biofertilizante que va a permitir obtener un producto agrícola de calidad y sin generar consecuencias al ambiente.(134)

Por las anteriores afirmaciones, el procedimiento llevado a cabo para la obtención del sobrenadante puede ser útil en la elaboración de biofertilizantes, con fines de control biológico tiene el potencial para favorecer la disponibilidad de fósforo en el suelo.

6.1.4. Presencia de Sideróforos

El medio de cultivo Cromo Azurol Sulfonato es usualmente empleado para la determinación cualitativa de sideróforos, pues presenta muy bajas concentraciones de hierro ($1\text{ mM } FeCl_3 \cdot 6H_2O$), condición esencial para que se induzca la acción de sideróforos.(54) Las PGP que producen sideróforos utilizan el complejo Fe_3^{+} sideróforos para incorporar este metal al interior celular mediado por un receptor específico localizado en la membrana bacteriana. Este secuestro de hierro disminuye su disponibilidad en el medio para otros microorganismos carentes de este sistema y que en ocasiones son patógenos para las plantas.(51)

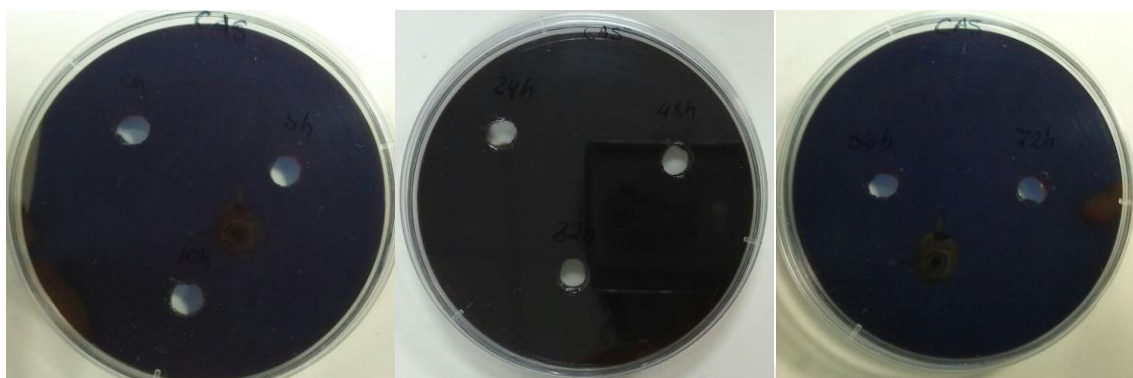


Figura 13. Evaluación de la presencia de sideróforos, en el muestreo realizado por 72 horas del fermentado de *Bacillus.sp*, en el medio de cultivo CAS-aminoácidos.

No se aprecia ningún cambio de color ni formación de halo, por lo que se reporta negativo para la presencia de sideróforos.

La mayoría de los organismos requieren hierro como un elemento esencial en una variedad de vías celulares metabólicas. La posibilidad de aislar e identificar microorganismos con una alta capacidad para producción de sideróforos que posean una mayor eficiencia para secuestrar este elemento ha sido de mucho interés en el campo para buscar mejoras de desarrollo ya que su presencia favorecería aún más la acción PGP. La presencia de sideróforos en placa se da por la formación de halos rodeando los inóculos con cambio de color entre anaranjado y amarillo mostrando como resultado positivo.

Siguiendo con los resultados obtenidos en este ensayo, se da negativo la presencia de sideróforos a estas condiciones en las que se encuentra la cepa *Bacillus.sp* en el medio mínimo mineral a condiciones infringidas para el proceso de endosporación en fermentación *bach* en tanque Biorreactor.

Pero en esta ocasión uno de los principales retos fue la preparación del medio CAS, se determinó que la presencia de PIPES genera una rápida precipitación, por lo que en la preparación su adición debe ser lenta, evidenciando la poca estabilidad del mismo cabe mencionar que para su estabilidad del pH con la adición de PIPES, se da el caso en el cual las reacciones toman una coloración rojiza al contacto con el reactivo, este

comportamiento se observó en el medio al ser sometido a esterilización por autoclave. Además, momento en el que se determinó el pH final del medio de cultivo, obteniendo que los pH oscilaban entre 5.5 y 6, siendo estos muy ácidos para continuar con la preparación del medio de cultivo, la solución a esto se dio al utilizar el buffer acetato el cual es de naturaleza orgánica, se notó que no había un cambio de color al pH requerido entre 7 y 7.5. De esta manera se determinó que la estabilidad del reactivo es independiente de la presencia de piperazina y que la cuantificación de sideróforos es confiable ya que la reacción con el reactivo CAS no se ve afectada por pH básicos.

En la actualidad también se explora la alternativa de aplicar sideróforos sintéticos como un medio para corregir las deficiencias de hierro en las plantas.(135)

Tabla 10. Resumen de resultados obtenidos en los análisis de propiedades para la acción PGP.

<i>Muestras(horas)</i>	<i>Producción de AIA</i>	<i>Solubilización de Fosfatos</i>	<i>Producción de sideróforos</i>
0	-	-	-
5	+	-	-
10	+	-	-
24	++	-	-
36	++	-	-
48	+++	-	-
56	++++	-	-
72	+++++	+	-

Metabolitos positivos (+) y metabolitos negativos (-).Tamaño de los halos de actividad y concentración creciente: (-) No se evidencia halo, (+-) Tamaño del halo < a 2mm, (+) Aproximado a 3 mm, (++) aproximado a 5mm, (+++) aproximado a 7mm, (+++++) aproximado a 11mm, (+++++) aproximado 12mm.

A partir de los resultados obtenidos que se presenta resumidos en la *Tabla 10* se podría suponer que las concentraciones de ambos metabolitos obtenidos de la cepa de *Bacillus.sp* de fermentación en un medio mínimo mineral en fermentación *batch* a nivel de biorreactor, aunque fueron bajas, puede ser suficiente para influenciar la promoción en la germinación y de crecimiento en plantas, ya que los reguladores de

crecimiento vegetal pueden actuar en bajas concentraciones como lo indica García et al con su investigación en el papel de las citoquininas en la promoción del crecimiento.(136) Lo que también se puede suponer, es que a altas concentraciones podría tener algún efecto negativo o de toxicidad.

3.1.5. Efecto metabólico en semillas de interés a nivel *in vitro*

La obtención de las semillas de lechuga, brócoli, rabanito y tomate se realiza en la semillerías del centro de ventas el huerto de la UNALM, procurando que sean semillas sin curar (sin fungicidas o plaguicidas), con buen estado germinativo.

3.1.5.1. Semillas de frijol:

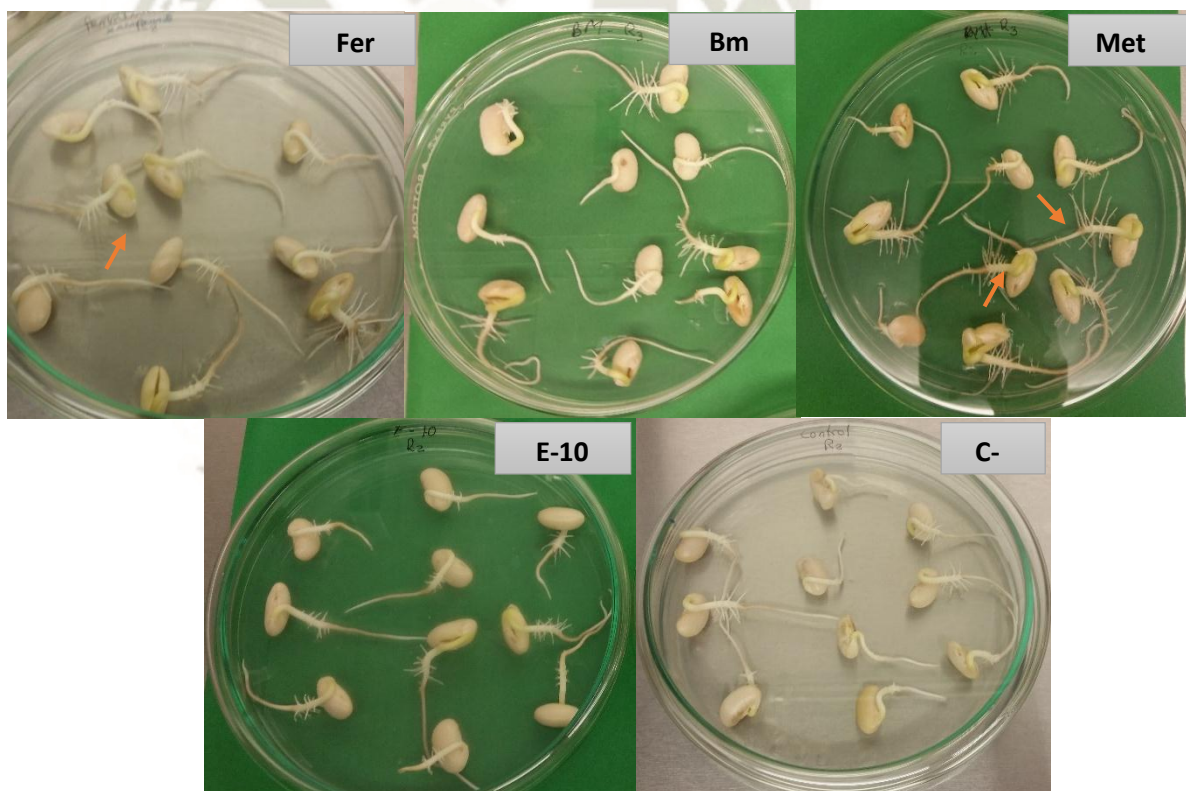


Figura 14. Respuestas biológicas expresadas en semillas de frijol, por tratamientos del fermentado de *Bacillus.sp* en placas con agar agua.

Una diferencia que se puede notar es la cantidad de pelos radicales y sus tamaños que se presenta en cada tratamiento mostrado en la *Figura 14* siendo las características fenotípicas más resaltantes en el tratamiento de metabolito y fermentado que el control blanco, pero también de igual parecido con la respuesta obtenida del control positivo *Rhizobium* E-10.

Tabla 11. Resumen estadístico de la evaluación del efecto metabólico en el crecimiento de hipocótilo en semillas de frijol de 24 a 96 horas.

TRATAMIENTO / (mm)	24h	32h	48h	56h	72h	80h	96h
Biomasa	0	0.7±1.9 A	3.1±4.1 A	3.36±4.3 A	12.8±6.0 A	13.1±6.0 A	13.6±6.1 A
Control	0	0.5±1.4 A	12.3±3.7 B	19.63±3.8 C	25.1±2.39 C	25.2±2.3 C	25.3±2.3 C
E-10	0	0.7±2.4 A	1.8±4.2 A	2.0±4.4 A	12±5.3 A	12.5±5.3 A	13.7±5.5 A
Fermentado	0	0±0 A	4.4±4.9 A	9.1± 5.3 B	14.5±5.5 A	14.9±5.3 A	18.3±6.5 B
Metabolito	0	6.0±3.8 B	10.2±3.8 B	10.5±3.9 B	21.0±3.6 B	21.5±3. B	23.9±3.5 C

La capacidad de promoción de crecimiento en el proceso de germinación por parte de los inóculos evaluados del fermentado, se evidencio en el registro de los estadios de las semillas durante 96 horas (*Tabla 11*). Uno de los primeros efectos denotados es que el primer brote de germinación se evidencio a las 36 horas (*Tabla 12*) en las semillas de frijol presentando un mayor tamaño de 6.0 mm de promedio en las semillas inoculadas con el sobrenadante o también mencionado en este ensayo como metabolito, en comparación con el control positivo utilizado el *Rhizobium* E-10 que promedio 0.7 mm y el control blanco (agua) mucho menor de 0.5mm.

Todos de los tratamientos de promoción de germinación en semillas de frijol presentó 100% de semillas germinadas y el análisis de datos incluyendo las réplicas de un mismo tratamiento arrojaron diferencias significativas, ya que durante las primeras dos evaluaciones estos resultados pueden darse por la variabilidad de germinación que presentan la semillas al reaccionar con la actividad de los inóculos, ya que no todas las semillas germinan al mismo tiempo o algunas simplemente nunca germinan.

Este índice expresa tanto el porcentaje de semillas germinadas como el porcentaje de crecimiento que alcanza el hipocótilo durante el bioensayo a las 72 horas. Estos

resultados mostraron que la sensibilidad del bioensayo de germinación de las semillas de frijol (*Phaseolus Vulgaris*) generó respuestas biológicas integradoras asociadas con la exposición de las semillas a muestras de los inóculos teniendo una buena respuesta de crecimiento del metabolito con referencia a los otros dos tratamientos de biomasa y fermentado (Figura 15), manteniendo estas diferencias entre cada uno de los tratamientos a lo largo del ensayo. Sin embargo, el control blanco presento de igual manera un buen estado de elongación de la radícula llegando a un mayor promedio de tamaño 25.1 mm se observa que al llegar entre las 72 y 96 horas este promedio se mantiene sin ningún cambio significativo quizás debido a que no posee más compuestos o nutrientes que favorezcan a largo plazo la buena condición de la semilla.

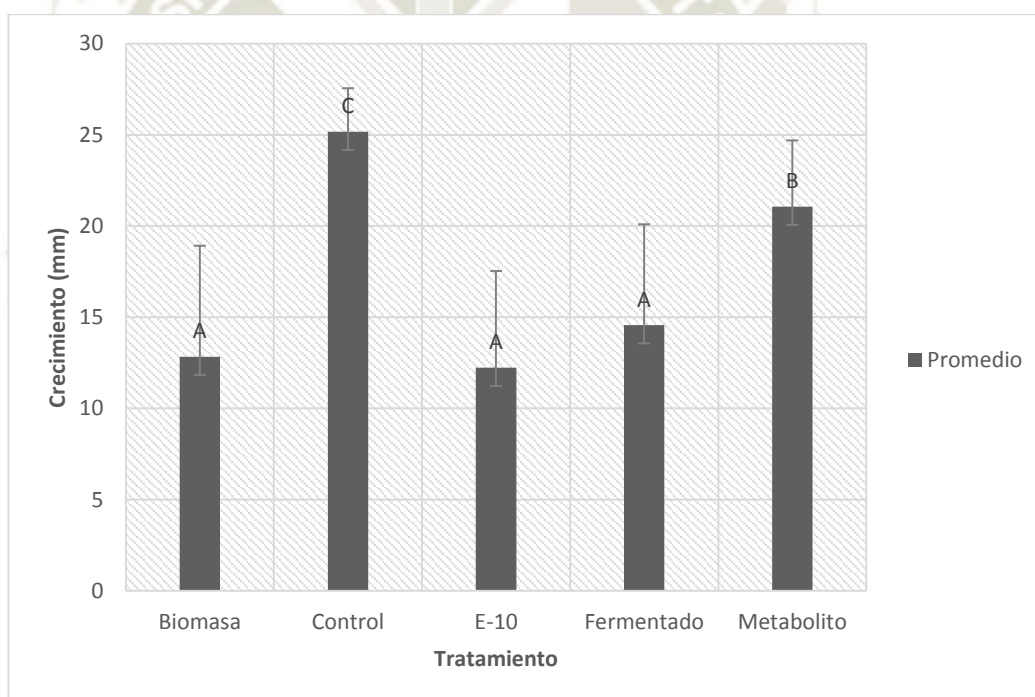


Figura 15. Promedios de evaluación del crecimiento de hipocótilo en semillas de frijol de cada tratamiento a las 72 horas de incubación.

Tabla 12. Promedio de la incidencia del fermentado de *Bacillus.sp* como tratamientos en el porcentaje del estímulo en germinación de semillas de frijol a las 32 horas.

Tratamientos	Promedio	Desviación Estándar	Tukey
Biomasa	13.33 %	15.2753	A
Control	13.33%	5.7735	A
E10	10%	10	A
Fermentado	0%	0	A
Metabolito	83.33%	15.2753	B

Para la variable de porcentaje de germinación en la evaluación a 32 horas en las que se ve los primeros datos del proceso (Tabla 12), se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas, que son representados con las letras A y B. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

El análisis de varianza y la comparación de medias nos indicaron que la mejor germinación se presentó con el inóculo de tratamiento metabolito, el sobrenadante o también llamado metabolito, se obtuvo un 83.33 % de germinación superando porcentualmente al testigo en un 70 % el cual registró 13.33% de germinación, señalando que estas diferencias fueron estadísticamente significativas incluso con los otros tratamiento, teniendo un mismo porcentaje de diferencia entre la biomasa y el fermentado como se ve en la Tabla 12, esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad derecha de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa. (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla 13. Comparación múltiple de incidencia de los tratamientos del fermentado de *Bacillus.sp* en el porcentaje de germinación de semillas de frijol a las 32 horas.

Contraste	Sig.	Diferencia
Biomasa - Control		0
Biomasa - E10		3.33333
Biomasa - Fermentado		13.3333
Biomasa - Metabolito	*	-70
Control - E10		3.33333
Control - Fermentado		13.3333
Control - Metabolito	*	-70
E10 - Fermentado		10
E10 - Metabolito	*	-73.3333
Fermentado - Metabolito	*	-83.3333

- Indica una diferencia significativa.

El asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. Se entiende al ver el valor negativo que el segundo componente es mayor al primero como en el primer asterisco Metabolito es mayor a Biomasa, mientras que los positivos indican la diferencia mayor al primer componente mayor al segundo mostrados en la *Tabla 13*.

Se muestra en la tabla superior mencionada los cuatro asteriscos que muestran diferencia significativa entre los pares mostrados de color rojo, representan el mayor valor porcentual para el tratamiento metabolito, con mayor efecto frente los otros cuatro tratamientos a las 32 horas donde se reporta el inicio de germinación.

3.1.5.2. Semillas de Brócoli:

Las semillas de brócoli en evaluación in vitro de germinación se encontró diferencia significativa para la variable crecimiento de hipocótilo y los pelos radiculares. Las semillas presentaron un área de mayor crecimiento longitudinal en el tratamiento de metabolito 5.8 mm a las 56 horas, en comparación con el blanco 1.3 mm y el control positivo de 4.1 mm, entre los tratamientos del fermentado y biomasa no hubo diferencia significativa presentan efectos de crecimiento muy similares, estos efectos se ven constantes a lo largo del crecimiento de la semilla como hasta finalizar las 96 horas que el mejor tratamiento el metabolito tiene el mejor promedio 16.8 mm (*Tabla 14*).

Tabla 14. Resumen estadístico de la evaluación del efecto metabólico en el crecimiento de hipocótilo en semillas de brócoli de 24 a 96 horas de incubación.

TRATAMIENTO/(mm)	24h	32h	48h	56h	72h	80h	96h
Biomasa	0	0.1±0.4 AB	2±2.5 AB	3.4±3.9 AB	5.7±6.5 A	6.9±7.9 A	8.0±9.0 A
Control -	0	0.1±0.3 AB	0.7±1.7 A	1.3±1.8 A	4.5±4.3 A	5.2±4.6 A	7.2±6.14 A
E-10	0	0.3±0.1 A	2.5±2.6 B	4.1±3.8 B	8 ± 6.5 AB	8.6±6.8 AB	10.4±8.1 A
Fermentado	0	0.3±0.1 A	2±1.8 AB	3.7±3.0 AB	7.0±5.9 AB	8.3±6.9 AB	10.8±8.7AB
Metabolito	0	0.3±0.4 B	3.6±2.5 B	5.8±4.1 B	10.4±6.3 B	13.1±8.0 B	16.8±10.0 B

Los resultados de las semillas de brócoli evidencian un efecto en su germinación por los tratamientos aplicados demostrando su acción promotora sobre el crecimiento vegetal de hortalizas como en comparación con diferentes investigaciones con cepas de *Rhizobium* de gran efecto promotor del crecimiento de las plantas llamado: desafíos y oportunidades (137), como el desarrollo de la semillas con efecto de estimulación por extractos en germinación.

Otra de las partes en las que se evidencia diferencias entre los inóculos de los tratamientos y sus repeticiones es la formación de los pelos radiculares formados en las semillas visualmente se denotan en la *Figura 16*, las semillas de brócoli tienen avanzado desarrollo con el tratamiento metabolitos en comparación con el control.

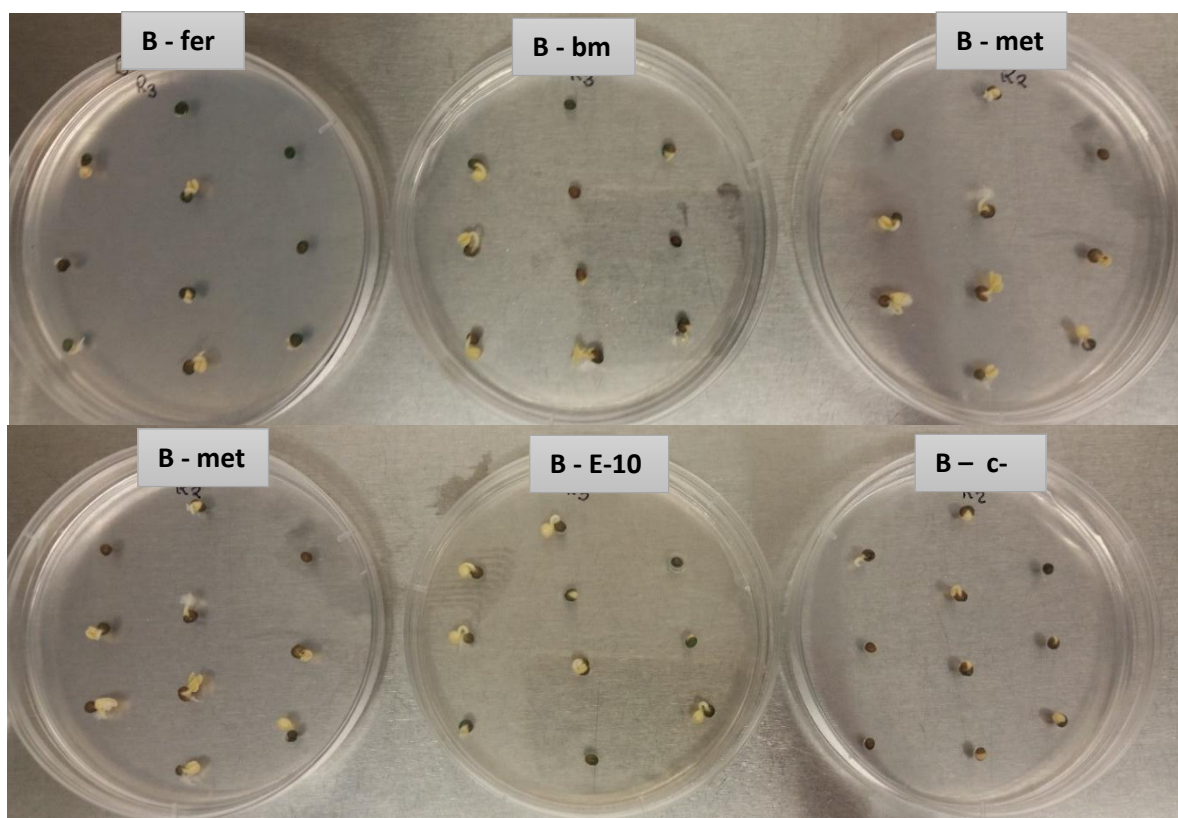


Figura 16. Respuestas biológicas expresadas en semillas de brócoli, por tratamientos metabólicos del fermentado de *Bacillus.sp* en placas con agar agua.

La *Tabla 15* presenta el porcentaje de germinación de las semillas de brócoli a las 32 horas con los cinco tratamientos del fermentado, promediando el resultado de las tres repeticiones de cada tratamiento evaluando por tratamiento un total de 30 semillas, este cálculo del porcentaje en la germinación se realizó con la finalidad de comprobar si los tratamientos pueden dar alguna alteración tanto desfavorable siendo alguna respuesta toxica o favorable como lo que se ve para esta semilla, es favorable el tratamiento de metabolitos presentando un mayor porcentaje a estas primeras horas de germinación mostrando el 30% a diferencia del control con solo 10% al igual que los demás tratamientos, como también en el transcurso del ensayo se observa a las 56 horas (*Figura 17*) que aún perdura el efecto en su desarrollo con el crecimiento del hipocótilo es mayor en promedio del tamaño para el inoculo metabolito en comparación con otros tratamientos.

Tabla 15. Promedio de incidencia de los tratamientos del fermentado de *Bacillus.sp* en el porcentaje de germinación de semillas de brócoli 32 horas de inoculado.

32horas	
Tratamiento	Promedio
Biomasa	10%±17.3 A
Control	10%±10.0 A
E10	0%
Fermentado	0%
Metabolito	30%±10.0 A

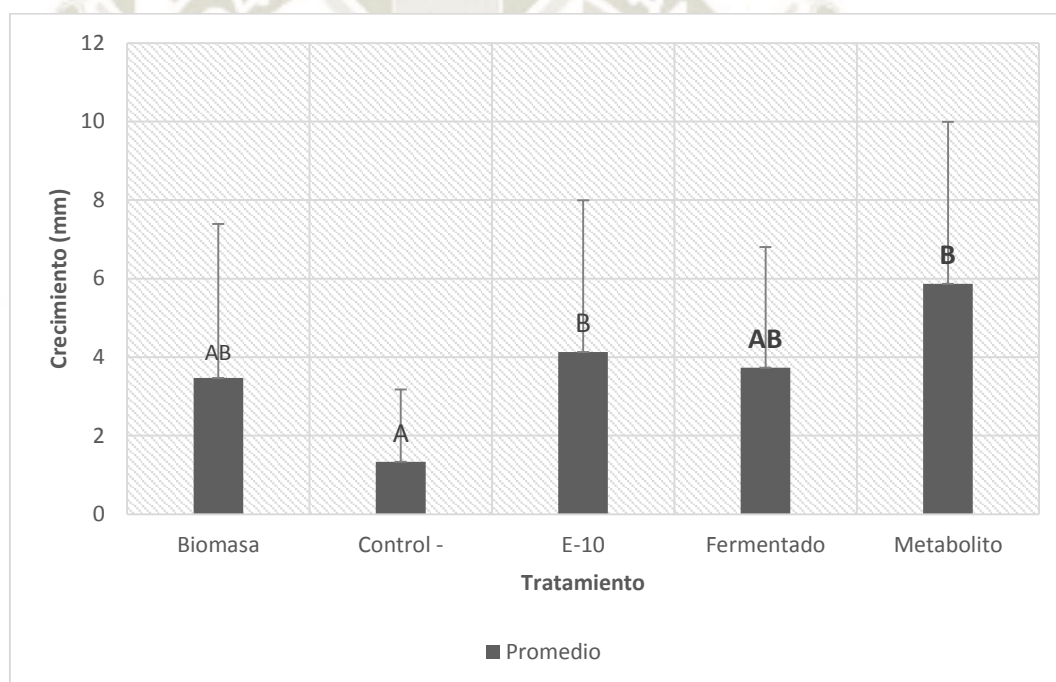


Figura 17. Promedios de evaluación del crecimiento de hipocótilo en semillas de brócoli de cada tratamiento a las 56 horas de incubación.

3.1.5.3. Semillas de Rabanito:

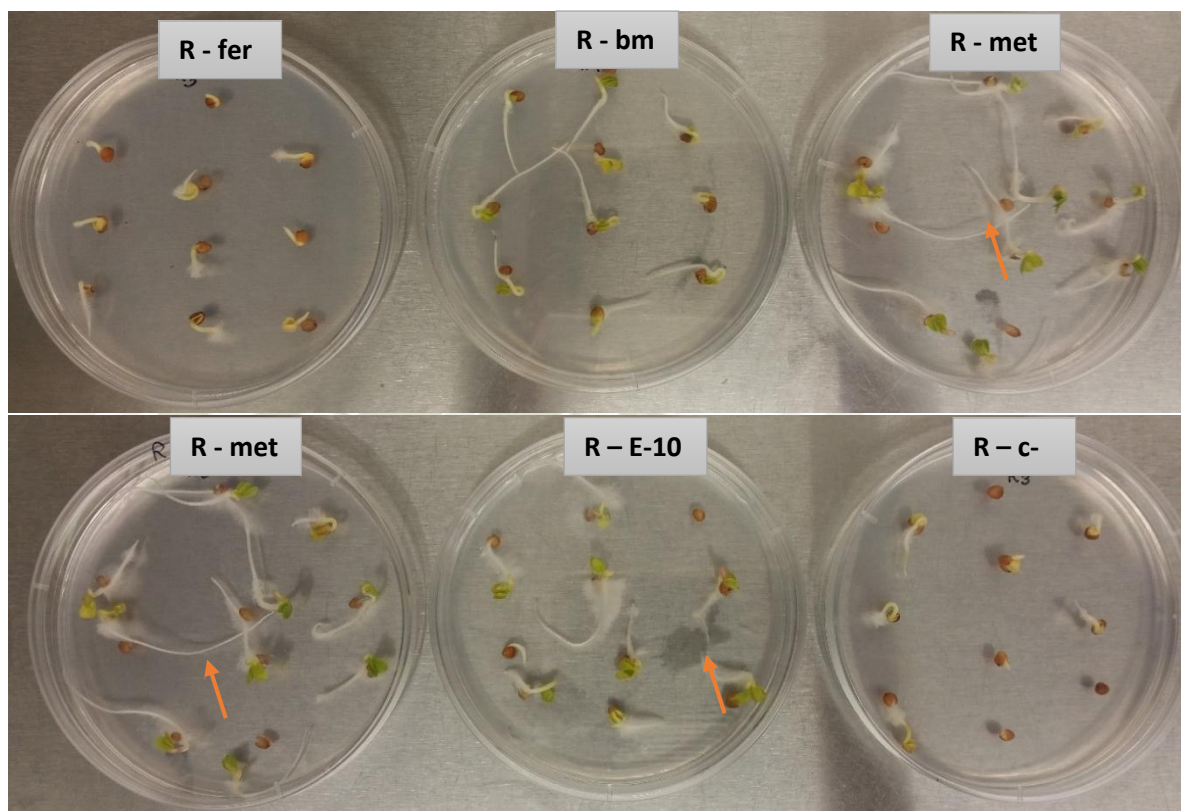


Figura 18. Respuestas biológicas expresadas en semillas de rabanito por tratamientos metabólicos del fermentado de *Bacillus.sp* en placas con agar agua.

La Figura 18 muestra los resultados obtenidos mediante las fotografías obtenidas al final de la evaluación mostrando el desarrollo de las semillas de rabanito, donde se observa como registró que el número de semillas germinaron normalmente respecto al total de las semillas colocadas al iniciar el ensayo en cada tratamiento, considerando como criterio de germinación la aparición visible del hipocótilo o brote de radícula. Utilizado una regla y papel milimetrado se midió cuidadosamente la longitud del hipocótilo y radícula de cada una de las plántulas, se obtuvo un mejor desarrollo en el tratamiento de metabolito, con un aspecto de mayor crecimiento con relación al control de *Rhizobium* E-10 que es una cepa con actividad PGP ya confirmada, al comparar los resultados se obtiene las medidas en similares promedios de longitud de

hipocótilo, lo que atribuye un buen efecto de promoción de crecimiento al tratamiento en evaluación y también como un indicador para determinar la capacidad de establecimiento de la planta, notado también el mayor número de pelos radiculares que complementarían el resultado, lo que señala la potencialidad del uso de los tratamientos como sustancia para un ambiente nutritivo para planta.

Tabla 16. Resumen estadístico de evaluación del efecto metabólico en el crecimiento del hipocótilo en semillas de rabanito de 24 a 96 horas de incubación

TRATAMIENTO / (mm)	24h	32h	48h	56h	72h	80h	96h
Biomasa	0	0.2±0.4 AB	6.7±3.6 B	11±5.6 C	14.6±6.6 B	15.4±6.9 B	16.2±6.9 AB
Control -	0	0.3±0.4 AB	0.9±0.9 A	1.2±1.0 A	7.7±3.3 A	8±3.4 A	11.9±4.9 A
E-10	0.03±0.1 A	0.6±1.0 B	7.2±5.14 B	9.4±5.5 C	17.4±9.8 BC	17.8±9.9 B	21.0±11.1BC
Fermentado	0	0.2±0.4 AB	3.4±2.4 A	5.7±3.7 B	9.1±4.8 A	9.6±4.8 A	11.6±5.1 A
Metabolito	0	0.1±0.3 A	10.7±6.0 C	12.3±6.4 C	20.1±9.3 C	20.6±9.5 B	23.5±10.3 C

La Tabla 16 muestra los promedios de cada tratamiento en las semillas de rabanito, midiendo el largo de hipocótilo en el desarrollo de germinación, igualando así el tratamiento de metabolito o sobrenadante frente al tratamiento control positivo E-10 con 23.5 mm y 21.0 mm respectivamente, estos se remarcan en la tabla los mayores valores de color rojo, son mayores hasta el término de la evaluación en comparación a los otros tres tratamientos que van con un crecimiento de cambio de medidas de tamaño lento como el fermentado y el control negativo o testigo que alcanzan 11.6 mm y 11.9 mm respectivamente, el tratamiento de biomasa reporta valores con poco incentivo en la germinación de las semillas.

Por esto es posible encontrar diferencias significativas entre tratamientos para estos índices, al observar las diferencias se continuo con la determinación de efecto de los tratamientos en cada índice, así establecer los tratamientos de mayor significancia en cada tiempo evaluado siendo los mejores los primeros mencionados el extracto metabolito y el control positivo E-10 este último precisa el efecto de la inoculación en las semillas con caldo microbiano y así establecer la actividad biológica del microorganismo con acción PGP.

El ácido indol acético (AIA) es un regulador del crecimiento vegetal perteneciente al grupo de las auxinas, el cual estimula el crecimiento y sistema radicular,

incrementando el acceso de la planta a los nutrientes del suelo, Estos resultados confirman el hecho de que, durante el periodo de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos, por lo que las diferencias de las barras que representan los valores de la evaluación de hipocótilo y radícula (*Figura 19*), viendo una gran diferencia con el control y los datos obtenidos con los tratamientos el mejor el inóculo de metabolito, sin embargo sin mucha diferencia efectiva con el fermentado y el inóculo de E-10 lo que representa las diferencias agrupado en los resultados en el gráfico mediante letras A, B, C que representan las diferencias significativas entre los cinco inóculos de tratamiento. Al mencionar el control testigo se puede mencionar que los datos se encuentran dentro del tiempo señalado como requerido para dar inicio a la germinación de las semillas de rabanito en condiciones normales reportado alrededor de cinco días.

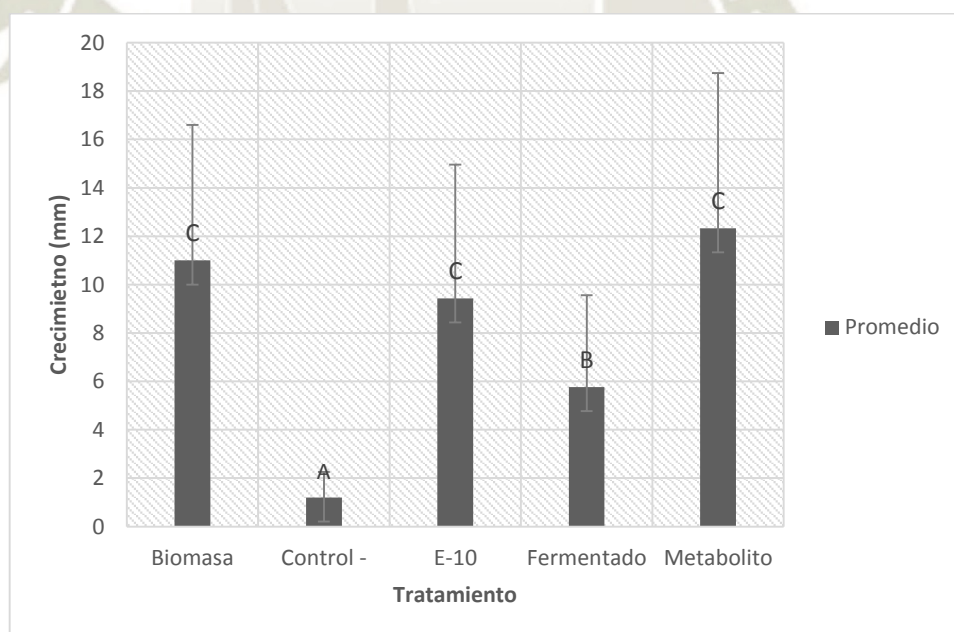


Figura 19. Promedios de evaluación del crecimiento de hipocótilo en semillas de rabanito de cada tratamiento a las 56 horas de incubación.

Tabla 17. Promedio incidencia de los tratamientos del fermentado de *Bacillus.sp* en el porcentaje de germinación de semillas de rabanito 32 horas.

Tratamientos	Promedio
Biomasa	20% \pm 17.3 A
Control	30.6% \pm 5.7 A
E10	30% \pm 20 A
Fermentado	23.3% \pm 20.8 A
Metabolito	36.3% \pm 23 A

En la *Tabla 17* las semillas de rabanito se caracteriza por tener una pronta germinación alrededor de las 72 horas en adelante en sus condiciones adecuadas lo que se evidencia en el ensayo que ya a las 36 horas se tiene un porcentaje de germinación del 30% en promedio del total de las repeticiones siendo la mayor de 36.3% el tratamiento de metabolito en comparación con el 30% del control positivo *Rhizobium*, pero sin embargo no hay una diferencia significativa en la promoción de germinación de semillas de rabanito con respecto a los otros tratamientos, el menor valor fue el de biomasa y fermentado con 20 y 23% respectivamente.

6.1.5.4. Semillas de Lechuga:

La respuesta de las semillas a distintos estímulos como en este caso los inóculos de tratamiento usados influye a una posible inhibición o influencia a la germinación mediante la elongación del hipocótilo y radícula (*Figura 20*). Las diferentes respuestas de las plantas a los inóculos se pueden explicar por las similitudes entre las distintas especies, variedades o incluso, en algunos casos las causas de estas respuestas pueden deberse a las exigencia distintas de las semillas de lechuga a las demás utilizadas en el ensayo *in vitro* de semillas en este caso la influencia de los inóculos es muy baja no hay diferencia significativa entre los tratamientos junto con el tratamiento blanco es decir en solo agua, de esta manera el control positivo E-10 resulto con promedio algo mayor como se ve en la *Tabla 18* donde se remarca los valores de color rojo algo más altos.

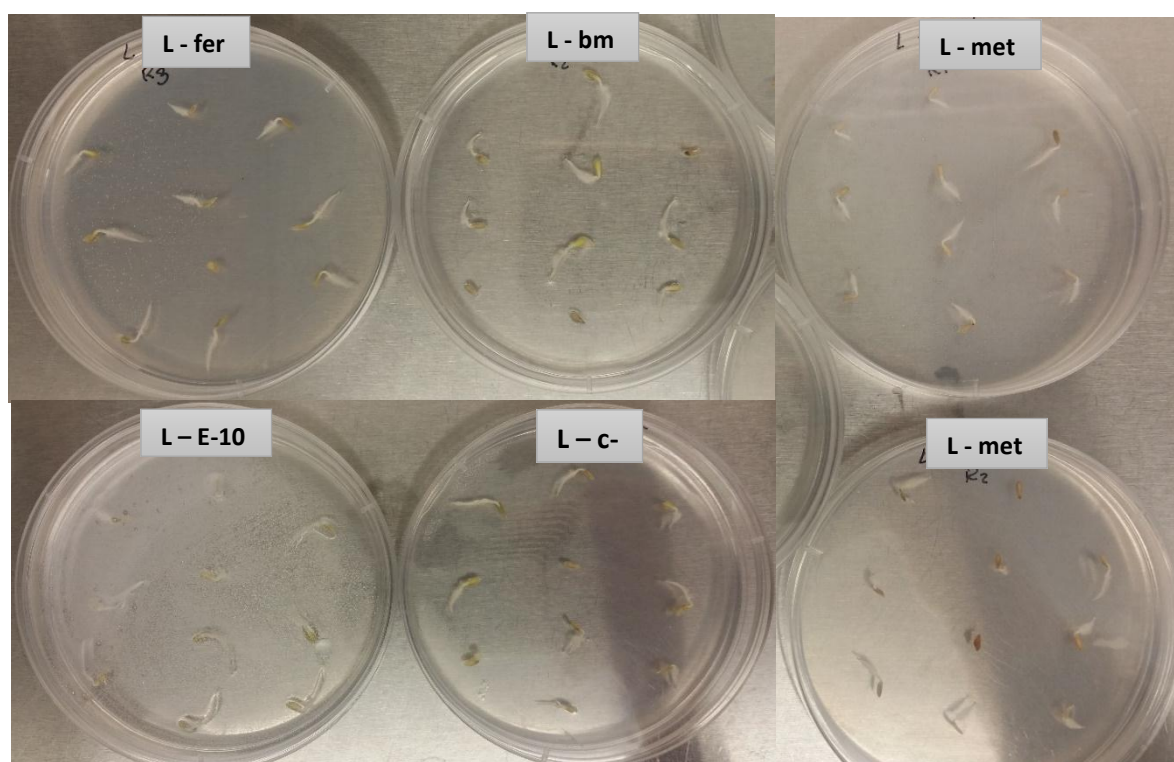


Figura 20. Respuestas biológicas expresadas en semillas de lechuga por tratamientos del fermentado de *Bacillus.sp* en placas con agar agua.

Tabla 18. Resumen estadístico de evaluación del efecto metabólico en el crecimiento de hipocótilo en semillas de lechuga de 24 a 96 horas de incubación

TRATAMIENTO/ (mm)	24H	32H	48H	56H	72H	80H
BIOMASA	0	0.2±0.6 AB	4.4±3.2 AB	5.8±4.0 A	9.9±6.1 A	10.2±6.2 A
CONTROL -	0	0.2±0.6 AB	4.9±2.9 AB	8± 4.4 AB	11.7±5.3 A	11.9±5.3 A
E-10	0.03±0.18	0.2±0.4 A	6.6±3.8 B	10.0±4.6 B	16±6.5 B	16.3±6.5 B
FERMENTADO	0	0.6±0.8 B	5.3±3.5 AB	7.6±4.4 AB	11.4± 5.6 A	11.8±5.6 A
METABOLITO	0	0.3±0.4 AB	4.0±2.3 A	5.4±2.5 A	10.6±4.6 A	11.5±4.8 A

El test para el índice de germinación dio diferencias no significativas en los tratamientos con respecto al testigo, de igual manera los casos fueron inferiores al control positivo (*Figura 21*). Este menor crecimiento podría atribuirse a alguna pequeña variación en las condiciones experimentales, por ejemplo ya que la

temperatura, luminosidad y humedad fueron los mismos en todo el ensayo y según lo hallado éstos son los tres factores que más afectan los resultados de los bioensayos pueden ser distintos los requerido por la semillas. No obstante, en ningún caso la reducción en el crecimiento llegó a ser del 50% con respecto al testigo, como para ser considerada tóxica. La única diferencia encontrada es que también en la *Figura 20* se puede resaltar la diferencia en el volumen de pelos radiculares con mayor cantidad en el tratamiento de fermentado y metabolito a diferencia del testigo y control positivo. En el transcurso del ensayo como casi finalizando a las 56 horas de evaluación (*Figura 21*) ninguno de los tratamiento logra un crecimiento significativo con respecto al control testigo, únicamente el control positivo E-10 mostrando la eficiencia de promoción de crecimiento que lo caracteriza.

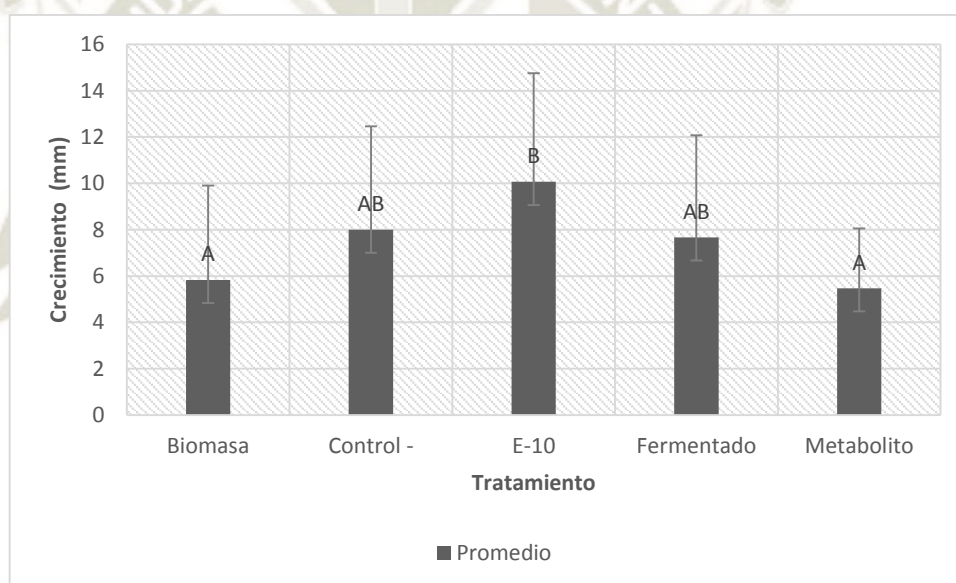


Figura 21. Promedios de evaluación del crecimiento de hipocótilo en semillas de lechuga de cada tratamiento a las 56 horas de incubación.

El porcentaje de germinación promedio de los tratamientos fue de 43.3% y 36.6% para el fermentado y el metabolito respectivamente manteniendo una diferencia con el testigo únicamente a las 32 horas (*Tabla 19*), indicando que no hubo ningún efecto de toxicidad sobre la germinación, siguiendo los criterios fenotípicos de las semillas que se considera cuando los porcentajes de germinación se encuentran entre 75 y 90% con respecto al testigo y al final de la evaluación llegando a casi una totalidad de germinación lo que se discute en esta ocasión es que hay uniformidad es decir no hay

cambios que se denote la influencia de la actividad de los inóculos, siendo así para las semillas de lechuga .

Tabla 19. Promedio de la incidencia de los tratamientos del fermentado de *Bacillus.sp* en el porcentaje de germinación de semillas de lechuga a las 32 horas.

Tratamientos	Promedio
Biomasa	13.3±5.7 A
Control	13.3±11.5 A
E10	16.6±5.7 A
Fermentado	43.3±5.2 ^a
Metabolito	36.6±5.7 A

6.1.5.5. Semillas de Tomate:

En la *Tabla 20* se ve los valores de promedios obtenidos en la evaluación de semillas de tomate de 24 horas a 96 horas, se puede observar que en los primeros brotes de germinación se dan a partir de las 48 horas casi de manera uniforme en sus valores en todos los tratamientos, se remarcan de color rojo los mayores promedio de medida a cada una de las horas de evaluación se observa que en la mayoría se mantiene pero el tratamiento control positivo (E-10) con una medida de 10.2 mm a la mitad de la evaluación y con 21.5 mm al final de la evaluación, los demás inóculos no superaron el efecto de promoción de crecimiento en las semillas de tomate siendo el mejor el C+ por no encontrar diferencias trascendentes con respecto al testigo, el metabolito biomasa y fermentado fueron inferiores en las medidas con relación al control positivo a lo largo del tiempo. Como también se ve el avance con respecto al porcentaje de germinación de las semillas de tomate se observa a las 48 horas y 56 horas no hay mucha diferencia de valores significativos se mantiene constante en su desarrollo normal de germinación sin estimulación adicional de los extractos inoculados por lo que se obtiene que todos los tratamientos están conformados por el nivel A en la prueba Tukey le da una igualdad entre ellos (*Tabla 21*), lo recomendado sugiere trabajar con efecto de los inóculos con la finalidad de obtener plantas de mejor

sistema radicular con mejor longitud y volumen, (Figura 22) pero tampoco se ve acción de incidencia de pelos radicales o pubescencia en el total en evaluación de las semillas de tomate.

Tabla 20. Resumen estadístico de la evaluación del efecto metabólico en el crecimiento de hipocótilo en semillas de tomate de 24 a 96 horas de incubación.

TRATAMIENTO/(mm)	24h	32h	48h	56h	72h	80h	96h
Biomasa	0	0	1.4±1.3 A	4.0±2.3 AB	8.6±4.9 AB	12.2±8.7 A	18.1±10.0 A
Control -	0	0	1.4±1.4 A	5.2±4.5 B	8.9±6.2 AB	13.8±8.8 A	20.1±11.9 A
E-10	0	0	1.4±1.1 A	5.6±3.6 B	10.2±5.3 B	14.5±6.7 A	21.5±8.6 A
Fermentado	0	0	0.9±1.1 A	2.7±2.0 A	5.9±4.3 A	12.9±9.8 A	16.6±11.1 A
Metabolito	0	0	1.0±1.0 A	4.1±2.4 AB	7.8±4.2 AB	14.0±7.5 A	19.9±9.5 A

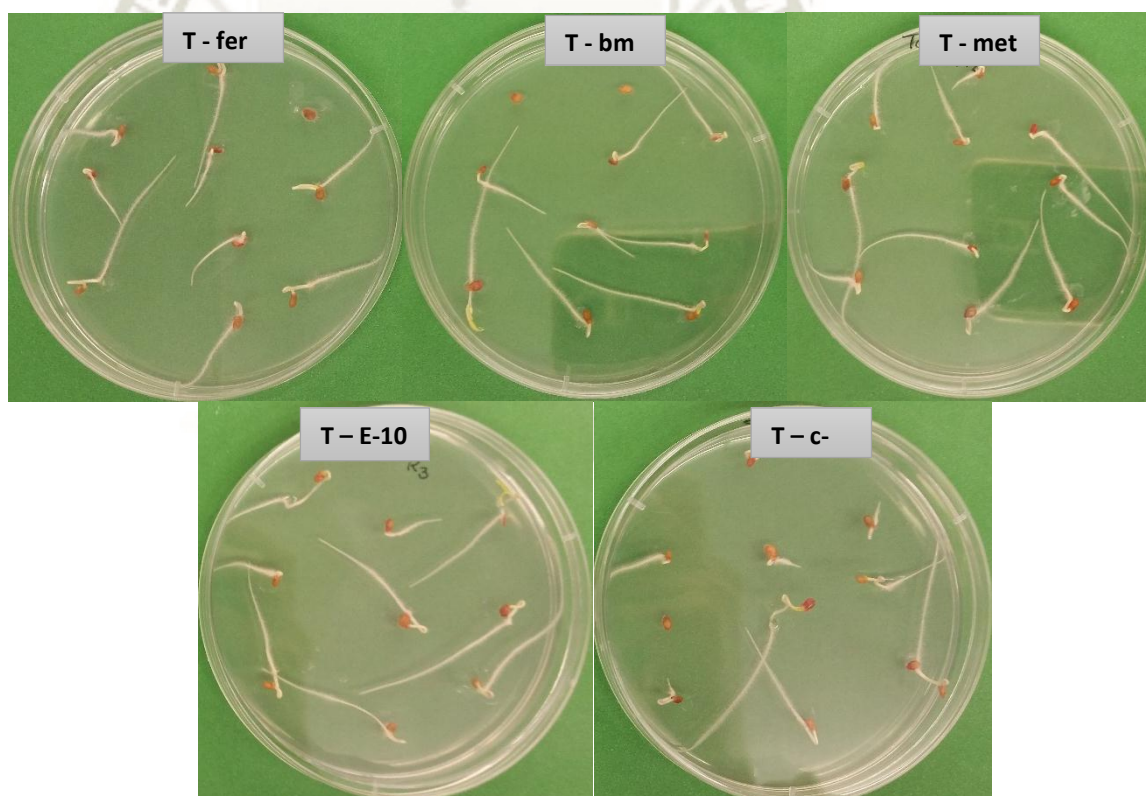


Figura 22. Respuestas biológicas expresadas en semillas de tomate por tratamientos del fermentado de *Bacillus.sp* en placas con agar agua.

De acuerdo al análisis de varianza realizado para esta variable a los siete días se tiene una respuesta significativa, al hacer la comparación de medias mediante la prueba de Tukey, se obtuvo que todos los tratamientos están conformado por distintos niveles, pero con poca variación entre ellos, analizando se obtiene que el más alto fue el tratamiento control positivo (Rhizobium E-10) seguido por el testigo (utilizado solo agua) de acuerdo eso los demás tratamientos no lograron alcanzar las medidas en el transcurso de la prueba como se puede apreciar a las 56 horas (*Figura 23*) aún mantiene esa diferencia de valores.

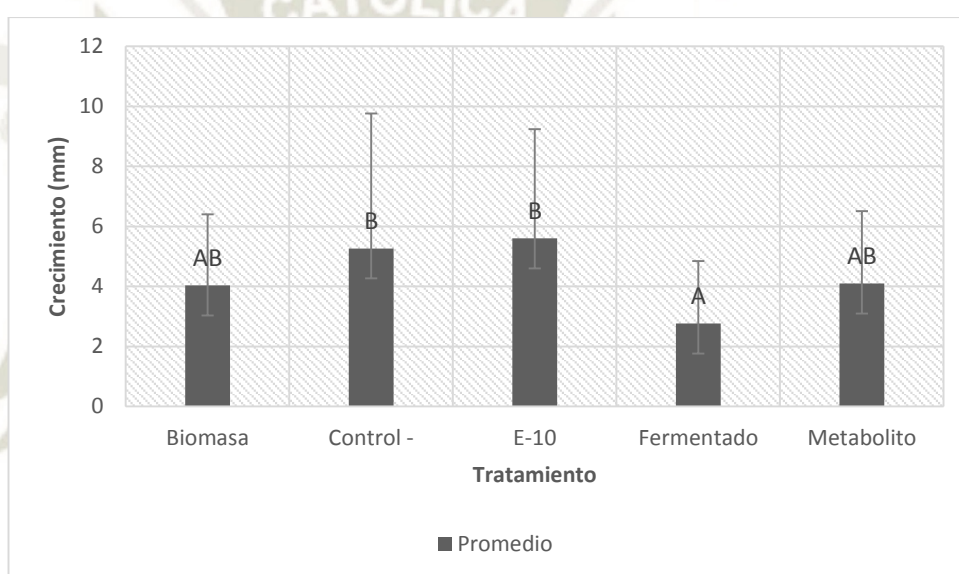


Figura 23. Promedios de evaluación del crecimiento de hipocótilo en semillas de tomate de cada tratamiento a las 56 horas de incubación.

La *Tabla 21* presenta el porcentaje de germinación de las semillas de tomate a las 48 y 56 horas con los tres tratamientos del fermentado y dos controles, promediando el resultado de las tres repeticiones de cada tratamiento evaluando con un total de 30 semillas, este cálculo del porcentaje en la germinación se realizó con la finalidad de comprobar si los tratamientos pueden dar alguna alteración tanto favorable como desfavorable siendo para esta última alguna respuesta toxica o favorable como lo que se ve para esta semilla es el tratamiento de E-10 presentando un mayor porcentaje a estas primeras horas del 73% seguido por el 60% y 56% de biomasa y control testigo respectivamente, en esta ocasión para el tomate inicia con menor porcentaje con

respecto a fermentado y metabolito siendo los extractos de importancia, sin embargo a partir de las 56 horas de evaluación estos no sobrepasan el control dando un efecto poco significativo.

Tabla 21. Promedio de incidencia de los tratamientos en el porcentaje de germinación de semillas de tomate a 48 horas.

Tratamientos /(mm)	Promedio 48H	Promedio 56H
<i>Biomasa</i>	60±17.3 A	90±0 A
<i>Control</i>	56.6±15.2 A	63.3±5.7 A
<i>E10</i>	73.3±11.5 A	86.6±11.5 A
<i>Fermentado</i>	43.3±20 A	76.6±15.2 A
<i>Metabolito</i>	50±17.3 A	83.3±20.8 A

En la *Tabla 22* se observa los resultados para las evaluaciones en semillas de tomate, lechuga y en general para las otras tres evaluadas, coinciden con que las especies tienen diferentes respuestas que dependen de muchos factores entre cada una de ellas, como tiempos de exposición, edad de las semillas, necesidades nutrientes o concentraciones entre otros.

Tabla 22. Comparación de promedio de los pesos de semillas por tratamientos obtenidos al final de la evaluación.

PESOS (g)					
TRATAMIENTO	FRIJOL	BROCOLI	RABANITO	LECHUGA	TOMATE
BIOMASA	12.75±0.4 BC	0.36±0.1 A	0.39±0.05 A	0.11±0.01 AB	0.35±0.06 A
CONTROL	9.83± 0.9 A	0.28±0.1 A	0.27±0.05 A	0.15±0.01 BC	0.33±0.01 A
E-10	15.01±1.24 C	0.38±0.07 A	0.63±0.1 A	0.16±0.02 C	0.37±0.04 A
FERMENTADO	11.37±3.9 AB	0.33±0.06 A	0.33±0.04 A	0.11±0.00 AB	0.33±0.03 A
METABOLITO	14.00±0.8 C	0.48±0.06 A	0.56±0.2 A	0.13±0.01 A	0.37±0.03 A

Los porcentajes de semillas germinadas y longitud de hipocótilo se tomaron por separado como variables dependientes para el análisis de datos.

Previamente se demostró que estas cepas de *Bacillus.sp* tienen la capacidad de producir auxinas estimuladoras del crecimiento vegetal y solubilizar fosfatos (138), lo que conjuntamente con los resultados de este trabajo, sustenta una interacción planta-

metabolito que permite establecer medidas integrales para el mejoramiento de la salud de la planta, que redundará en mayores rendimientos agrícolas.

El bioensayo con semillas es una prueba estática (96 horas de evaluación) en el que se pueden evaluar los efectos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos, se determina la actividad en la germinación y la actividad en la elongación de la radícula y del hipocótilo y pelos radiculares (*Figuras 14, 16, 18, 20, 22*). Es importante destacar que durante el período de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia puede mejorar la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran importancia frente a factores externos adversos. Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general. El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es de gran importancia para garantizar la supervivencia de la especie. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocótilo constituye indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta.

Con respecto a la prueba tradicional de germinación de semillas, la evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocótilo de las plántulas permite ponderar el efecto de compuestos solubles presentes, lo suficiente para generar respuesta favorable, también si los niveles de concentración no son altos como para inhibir la germinación, provocando retardar o inhibir completamente los procesos de elongación, dependiendo del modo, tiempo y sitio de acción del compuesto. De esta manera, la actividad en la elongación de hipocótilo y de la radícula constituyen indicadores importantes para la evaluación de efectos biológicos en vegetales, la *Tabla 22* aporta información complementaria, que proporciona al estudiar el efecto en la germinación de manera grupal en los tratamientos al final de la evaluación.

3.2. Presencia de enzimas hidrolíticas con actividad antifúngica contra *Rhizoctonia solani*

3.2.1. Detección de enzimas hidrolíticas extracelulares producidas

3.2.1.1. Presencia de Celulasas.

Se analizaron las diferencias entre las medias de los halos de hidrólisis de los extractos sobre el sustrato carboximetilcelulosa al 1.0% en placa, donde se obtuvo que los halos netos de hidrólisis de 9.59 mm y 10.65 mm (Tabla 23) de los inóculos de 56 y 72 horas respectivamente no se diferencian significativamente por lo cual presentan el mismo poder degradativo sobre este sustrato. Ambos fueron los que presentaron los mayores halos de hidrólisis pero obtienen el mismo efecto sobre este sustrato; mientras que hay una diferencia significativa sobre los tres primeros inóculos tomados hasta las 10 h, teniendo los primeros resultados con el menor halo de hidrólisis presentes entre las 24 y 48 horas (Figura 24).

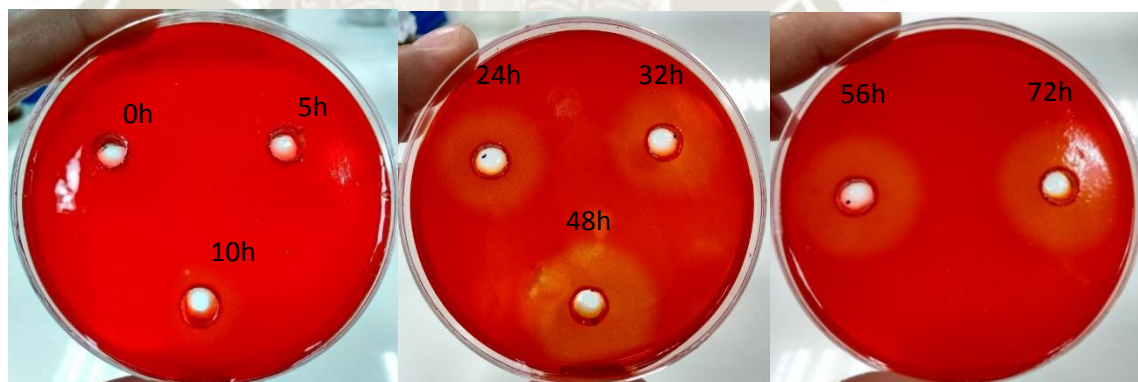


Figura 24. Actividad de hidrólisis de celulosa de las toma de muestras de 0 a 72 horas de sobrenadante del fermentado de la cepa *Bacillus.sp.*, en placas con medio CMC.

En la medición de halo se encontró una variación directamente proporcional entre el tamaño de halo y el tiempo transcurrido, sugiere la existencia de diferentes grados de eficiencia de hidrólisis representado la cantidad de presencia de las enzimas, las cuales fueron aumentando de acuerdo al avance del proceso de endosporación de la cepa de

Bacillus.sp. Los valores reportados son similares en respuesta de los halos generados *in vitro* por los aislamientos evaluados por Diego E. Zambrano Pazmiño et al, quien hizo el Aislamiento y selección de bacterias autóctonas de Manabí-ecuador con actividad celulolítica.(123) muestra 30 cepas bacterianas aisladas con halos de hidrólisis de celulosa entre 1.17 y 12.33 mm entre ellas la mayoría de genero *Bacillus*.

En la *Tabla 23* se muestran los 8 muestra con su repetición que tuvo respuesta positiva en cuanto a la capacidad celulolítica. Frente a las primeras horas de fermentación o inicio de la endosporación de la bacteria no mostraron actividad celulolítica alguna, lo cual tiene concordancia con capacidad celulolítica con respecto al proceso en que se van formando al emplear agar CMC.

Tabla 23. *Tamaño de halo (mm) en la prueba in vitro mediante la prueba de CMC por la acción de 8 muestras de sobrenadante de diferentes tiempos de fermentación bacteriana de Bacillus.sp.*

Muestras Primera repetición (h)	Halo neto (mm)	Muestras Segunda repetición (h)	Halo neto (mm)	PROMEDIO (mm)
0	0	0	0	0
5	0	5	0	0
10	0	10	0	0
24	4.08	24	4.21	4.14
32	5.62	32	6.42	6.02
48	7.58	48	9.28	8.43
56	8.53	56	9.59	9.06
72	10.47	72	10.65	10.56

3.2.1.2. Presencia de Amilasas

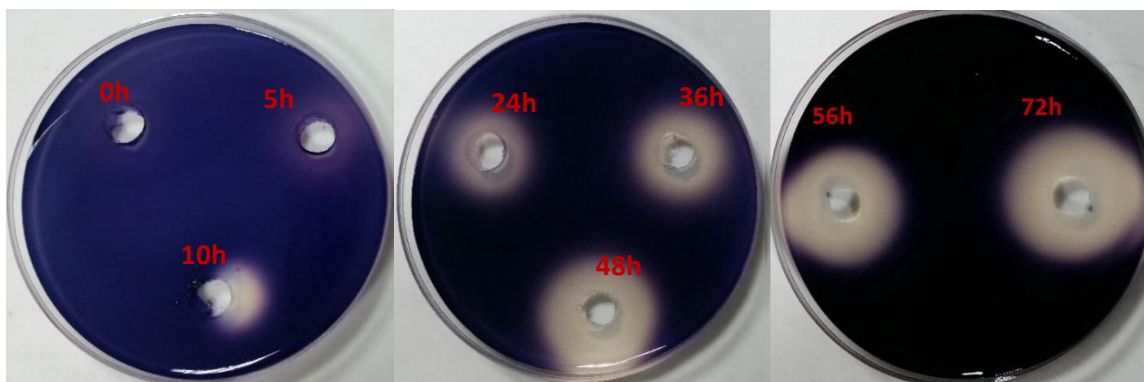


Figura 25. Actividad de hidrólisis de Amilasas de la toma de muestras de 0 a 72 horas de sobrenadante del fermentado de la cepa *Bacillus.sp* en placas con medio suplementado con almidón.

En la *Figura 25*, se observa halos alrededor del pozo de siembra de cultivo por la producción y presencia de amilasas en acción generando hidrólisis del almidón a partir de la alícuota de 100 uL colocados en cada pocillo de agar. Las amilasas son endoenzimas provenientes de la cepa *Bacillus.sp* que ocasionan la hidrólisis al azar de los enlaces α -(1,4)-glicosídicos de las cadenas lineales de amilosa, provocando una rápida licuefacción del almidón sin formación de azúcares simples, aunque queda hidrolizada una parte considerable del almidón formado por la amilopectina compuestos que no dan color con el yodo sublimado, a lo que fue sometido a sus vapores para dar a revelar en placa. Por lo que se observa los halos formados con relación al tiempo, a partir de las 0 a las 72 horas del ensayo de tomas de inóculo de 48 horas de incubación en las placas del medio, donde se visualiza que a las primeras 10 horas existe una mínima producción de amilasas, mientras que se evidencia que la concentración de dicha enzima incrementa notando proporcionalmente el área de hidrólisis cada vez mayor en la placa con medio enriquecido con almidón como fuente de carbono. La forma en que favorece la presencia de amilasas en el extracto utilizado al degradar la fuente de almidón presentes en el suelo, formando parte de la formación

de biofilm, es dando como nutriente la glucosa ayudando a que el hongo se vea afectado por dos o más organismos tratando de utilizar los mismos nutrientes, o bien de ocupar el mismo nicho o sitio de infección elevando la inhibición por competencia,(68) como lo mencionado por Beltrán Pineda, M.E et al, que menciona que juegan un papel fundamental en el ciclaje de nutrientes a nivel de suelo.

Tabla 24. *Tamaño de halo (mm) en la prueba in vitro con Agar almidón por la acción de 8 muestras de sobrenadante de diferentes tiempos de fermentación bacteriana de Bacillus.sp.*

Muestras Primera repetición (h)	Halo neto (mm)	Muestras Segunda repetición (h)	Halo neto (mm)	PROMEDIO (mm)
0	0	0	0	0
5	0	5	0	0
10	4.28	10	4.26	4.26
24	6.21	24	7.45	6.83
32	7.22	32	9.06	8.14
48	9.18	48	10.33	9.75
56	9.36	56	10.78	10.07
72	11.29	72	12.56	11.92

Este proceso de hidrólisis enzimática consiste en la acción de enzimas como catalizadores para romper las moléculas de almidón se dio evidenciado en los datos de resultados en su producción a partir de las 10 horas de inoculación de la bacteria al medio teniendo un mínimo halo de 4.26 mm (*Tabla 24*). El microorganismo va aumentando la concentración de amilasas en el transcurso del proceso, al mismo tiempo demostrando la posibilidad en un mayor rendimiento su mayor tamaño del halo resulto de 12.56 mm, lo que nos da valores muy buenos de producción en comparación

como ensayos de hidrólisis de otros microorganismos como en la investigación de Zavaleta et al.(139) presentando valores de entre 5 y 25 mm de diámetro de halos en la actividad de amilasas.

Finalizando resulta en esta evaluación de presencia de amilasas positivo para la producción de amilasas por la cepa *Bacillus.sp* utilizada en fermentación *Batch* a nivel de biorreactor en un medio mínimo mineral en la que involucra la endosporación de la bacteria *Bacillus.sp*.

3.2.1.3.Presencia de proteasas

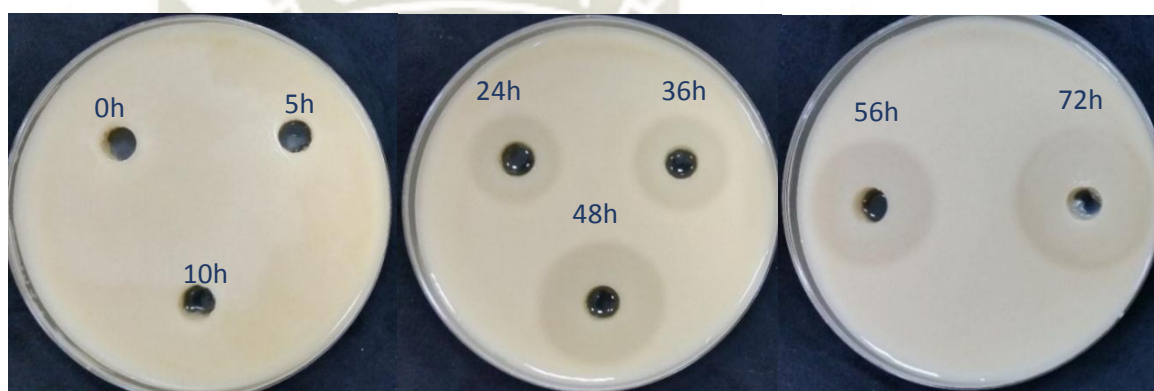


Figura 26. Actividad proteolítica de la toma de muestras de 0 a 72 horas de sobrenadante del fermentado de la cepa *Bacillus.sp*, en placas con medio proteico Agar leche.

Resultando positivo para la producción de proteasas por la cepa *Bacillus.sp* utilizada en fermentación *batch* a nivel de biorreactor en un medio mínimo mineral en la que involucra la endosporación de la bacteria *Bacillus.sp*, al ver los halos transparentes formados en la placa de agar leche como fuente de proteínas (Figura 26), la incubación de las alícuotas de 0 a 72 horas después de 48 horas incubación y revisión se muestra el perfil de la actividad enzimática con respecto al tiempo de cultivo, respaldando los antecedentes reportando proteasas producidas por *Bacillus.sp*. En fermentación líquida donde se alcanza la máxima actividad de halos en la determinación de proteasas con la técnica en placa con agar leche descremada, dicha hidrólisis se aprecia a través de la formación de halos alrededor de los pozos del inóculo de 100 uL, lo que indica actividad proteolítica de las enzimas presentes y sirven para confirmar los resultados

obtenidos donde se observa que las muestras con mayor actividad proteolítica se da a las 56 y 72 horas.

El extracto crudo o sobrenadante tomado en muestreo durante el proceso de fermentación presentó una actividad proteolítica evidente donde dentro de sus repeticiones el halo de mayor tamaño equivalente a la hidrólisis fue de 13.23 mm a las 72 horas (*Tabla 25*), el tiempo en la que se presenta las primeras cepas de la enzima en producción alrededor es a las 24 horas que presentó halos de 4.84 mm y 5.78 mm, una actividad enzimática buena en comparación a los resultados obtenidos en la investigación de Cruz Ramírez et al y Venant Nihorimbere et al, que incluye la actividad proteolítica de varias cepas microbianas (140) (141) como los principales productores de proteasas mediante la estimación de halos de hidrólisis durante el screening en placa con halos de 6 hasta 26 mm en un total de 14 cepas.

Se produce un incremento notable en la actividad proteolítica desde las primeras horas de fermentación, el presente trabajo confirma la elevación de cargas de proteasa.

Tabla 25. *Tamaño de halo (mm) de la acción de 8 muestras de sobrenadante del fermentado bacteriano de Bacillus.sp de la prueba in vitro en Agar Leche.*

Muestras Primera repetición (h)	Halo neto (mm)	Muestras Segunda repetición (h)	Halo neto (mm)	Muestras Tercera repetición (h)	Halo neto (mm)	PROMEDIO (mm)
0	0	0	0	0	0	0
5	0	5	0	5	0	0
10	0	10	0	10	0	0
24	4.84	24	5.52	24	5.78	5.38
32	6.13	32	7.02	32	7.24	6.79
48	8.11	48	11.22	48	10.97	10.1
56	10.51	56	11.78	56	11.39	11.22
72	11.33	72	12.91	72	13.23	12.49

3.2.1.4. Presencias de Quitinasas



Figura 27. Actividad Quitinolítica de la toma de muestras de 0 a 72 horas del sobrenadante fermentado de la cepa *Bacillus.sp.*, en placas con medio Agar quitina coloidal, observándose negativo para halos alrededor de los pozo de siembra de cultivo.

Para la evaluación de quitinasas *in vitro* no se evidencio la formación de algún halo en las muestras descartando la presencia de estas enzimas en todos los tiempos de muestreo obtenidos en el sobrenadante de la fermentación de a cepa de *Bacillus.sp.* Reportando así negativo para el ensayo *in vitro* de presencia de quitinasas.

Por otro lado, existen estudios que señalan al género *Bacillus* con un gran potencial en la producción de quitinasas. El sistema de quitinasas tiene un papel importante en la degradación de quitina, por lo que es crucial en la hidrólisis de la pared celular de hongos(126). La quitina es un polímero de residuos de N-acetil-D-glucosamina enlazados por unión β -1-4, y es un componente común de exoesqueleto de insectos, caparazón de crustáceos y pared celular de hongos. Se ha determinado la producción de quitinasas por algunas especies de *Bacillus* con potencial en control biológico.

3.2.2. Cuantificación de Proteínas total

Es conveniente realizar una curva de calibración cada vez que se procese una batería de muestras de concentración desconocida para corroborar la reacción que se produce con la que se hace las lecturas de absorbancias obtenidas de los patrones. La calibración puede realizarse en principio con cualquier preparado de proteínas homogéneo y lo más puro posible. Como sustancia de referencia se utiliza frecuentemente albúmina de suero bovino (BSA). Con estos valores de la *Tabla 26*, se realiza una curva de concentración midiendo la absorbancia a 595 nm de la que se interpolarán los valores de las muestras incógnitas de concentración desconocida (*Figura 28*).

En la curva se requiere obtener un R^2 adecuado, lo cual indica alta linealidad ($R^2=0,9912$). Se evaluó la cuantificación de proteínas totales con el método de Bradford.

Tabla 26. Absorbancias obtenidas de las muestras patrón para la evaluación de proteínas totales.

Concentración ug/mL	Absorbancias Obtenidas
0	0
1	0.086
2	0.158
5	0.225
10	0.332
15	0.433
20	0.527
30	0.695
40	0.869
50	1.027
60	1.228
70	1.397

La curva de calibrado transcurre linealmente a lo largo de todo el intervalo de concentración. Por lo tanto, el contenido de proteínas de muestras desconocidas se determina gráficamente

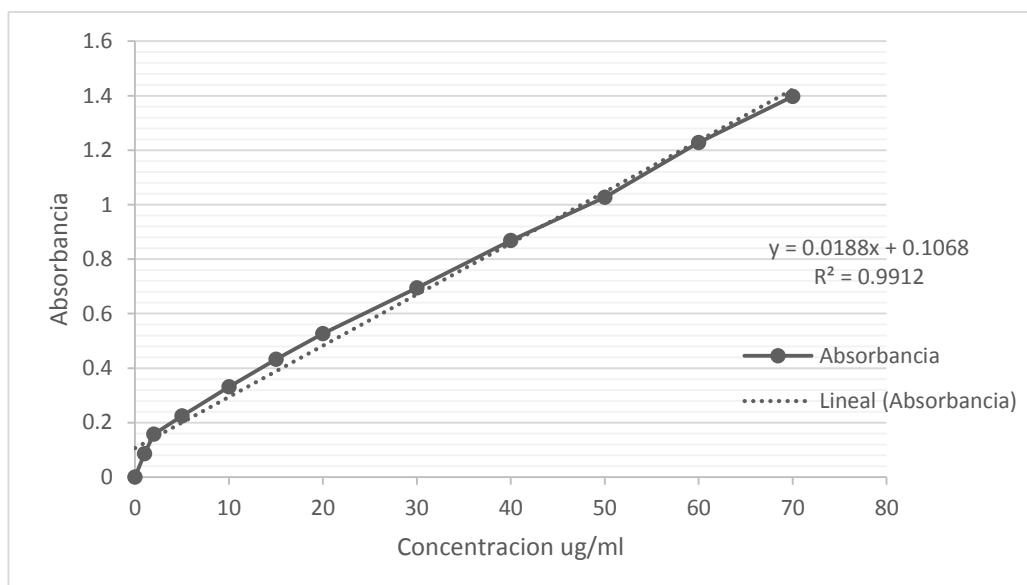


Figura 28. Curva patrón para proteínas totales con reactivo Bradford

La determinación de proteínas totales se realizó por el método de Bradford (1976) utilizando una curva de calibración con estándar de seroalbúmina bovina (BSA). Es un método colorimétrico rápido para la cuantificación de proteínas totales. El reactivo contiene principalmente Coomassie G-250 que junto con un reactivo en medio ácido (ác fosfórico incluido en el reactivo) se une a las proteínas. Esto provoca un desplazamiento espectral de la forma rojizo amarronado del colorante a un color azul.

En relación al contenido de proteína de las soluciones de las muestras del fermentado de *Bacillus.sp.* Sometidos al métodos de cuantificación resultando los valores de concentración (Tabla 27), se puede observar, que en todos los casos se presentaron valores confiables por estar dentro del rango lineal; que presentan buena correlación en las muestras, mostrando los valores de proteína con cambios mínimos de absorbancia a partir de las 10 horas obteniendo al convertir con los valores en la curva patrón 3.25 ug/mL y los más altos del ensayo a las 72 horas 52.77 ug/mL, el análisis de regresión reveló una buena correlación en el contenido de proteína (Figura 29), pero bajas en relación a lo obtenido por Cabra et al. En cuantificación de proteínas totales en extractos crudos de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de Boyacá y Cundinamarca en la que el mínimo de proteínas extraídas 150.71 ug/mL (142)

Tabla 27. Absorbancias promedio de las muestras de fermentado.

Muestras (h)	Absorbancias Obtenidas	Concentración ug/mL
0	0.114	0.38297872
5	0.159	2.77659574
10	0.168	3.25531915
24	0.426	16.9787234
36	0.598	26.1276596
48	0.785	36.0744681
56	0.842	39.106383
72	1.099	52.7765957

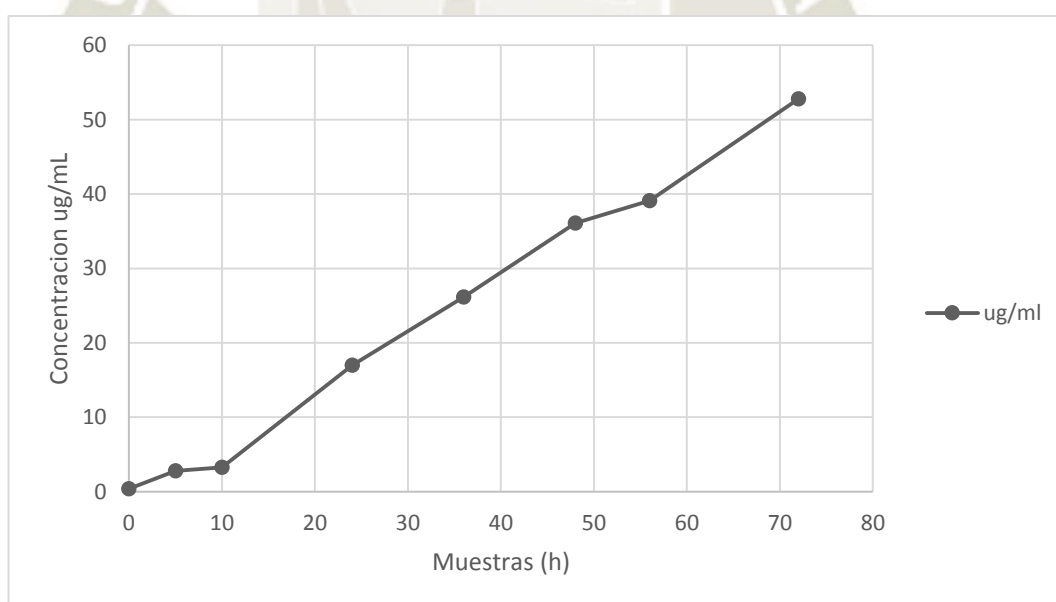


Figura 29. Curva de presencia de proteínas totales.

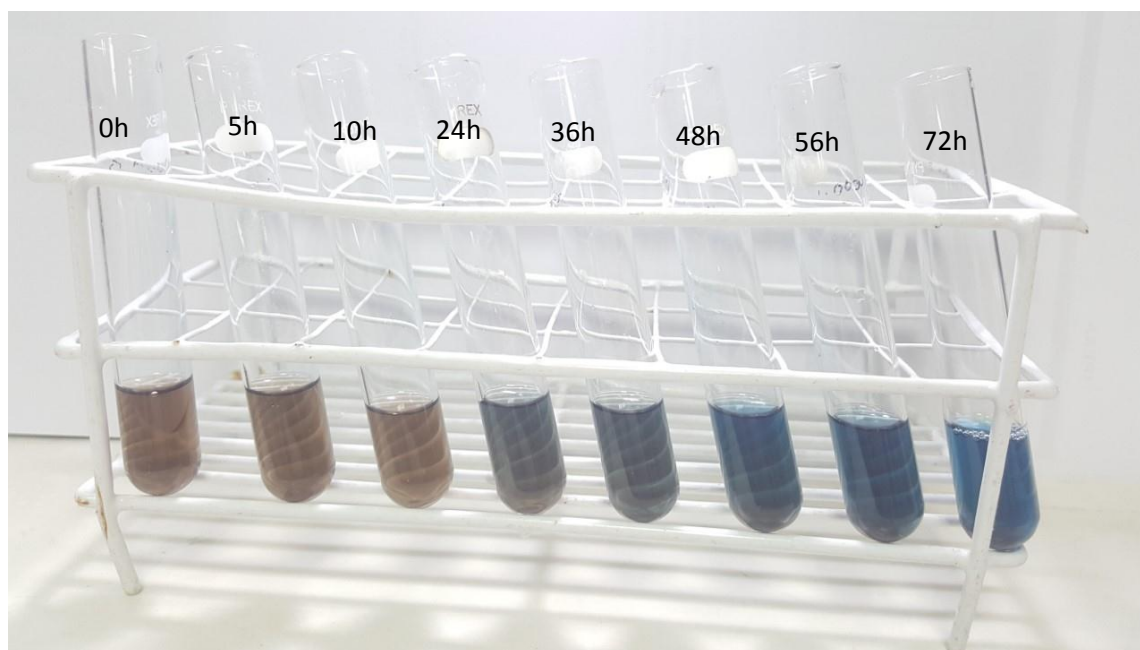


Figura 30. Evaluación de metabolitos del tipo proteico en las tomas de muestreo entre las 0 a las 72 horas, de sobrenadante del fermentado de *Bacillus.sp.*

En la *Figura 30* se observa la representación de las muestras de concentración desconocida preparadas para lectura de presencia de proteínas totales de la toma de muestras obtenidas de 0 a 72 horas, de la realización del proceso de fermentado tomando alícuotas del sobrenadante donde se encuentra las moléculas de formación como las enzimas. Resultado que se muestra una diferencia de intensidad de coloración que indica distintas concentraciones presente en la producción, el color obtenido en la reacción de formación con el reactivo azul de Coomassie G-250 (*Anexo 2*), se ha asociado con la presencia de ciertos aminoácidos básicos (principalmente arginina, lisina e histidina) en la proteína, aunque también participan en dicha unión las fuerzas de Van der Waals y las interacciones hidrofóbicas. De forma en que el número de ligados (*Anexo 3*), del colorante Coomassie que se une a cada molécula de proteína es aproximadamente proporcional a la cantidad de cargas positivas encontradas en esa proteína. Los aminoácidos libres y péptidos no desarrollan color con reactivos a base de colorante Coomassie; en general para la correcta utilización de este reactivo.

Finalmente, este ensayo da una idea con referencia a lo dicho por Norma Margarita De la Fuente-Salcido, que menciona que las combinaciones binarias de antimicrobianos más estudiadas en los últimos años se efectúan con moléculas de naturaleza proteica, las bacteriocinas.(143)(144) Las bacteriocinas más estudiadas y ensayadas en investigaciones *in vitro* e *in vivo* además de la Nisina, la Pediocina y la Enterocina producidas por bacterias ácido lácticas, no obstante, se ha confirmado que la mayoría de los microorganismos son capaces de sintetizar bacteriocinas, por ejemplo la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis*. Algunas cepas bacterianas como *Bacillus thuringiensis* han sido utilizadas para el control de insectos, ya que durante su fase de esporulación, *B. thuringiensis* forma cristales o cuerpos parasporales que contienen proteínas Cry que presentan actividad ante una gran variedad de insectos y cuyo efecto tóxico es incrementado por la acción de quitinasas bacterianas producidas por el microorganismo.(145)

3.2.3. Actividad Antagonista in vitro

El crecimiento de *R. Solani* en presencia de los ocho inóculos bacterianos muestra un porcentaje de inhibición a los 4 días significativamente superior respecto al porcentaje de inhibición encontrado desde las 0 a las 24 horas de inicio de incubación (Figura 31)

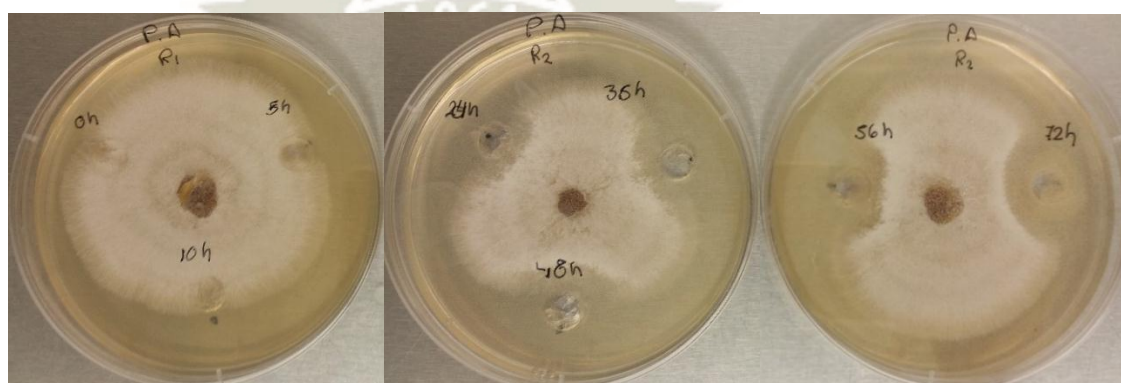


Figura 31. Inhibición del crecimiento del hongo *Rhizoctonia solani* por efecto del sobrenadante compuesto de metabolitos presentes en el fermentado de *Bacillus.sp*

Se presentó mayor actividad en los inóculos tomados en relación proporcional a la formación de los metabolitos producidos con respecto al tiempo de tomas del muestreo, los halos aparecen a partir de las 24 horas con 22.2% de inhibición de acuerdo a la formula $(R1 - R2)/R1 \times 100$ se obtiene para 36 h con 24.3%; 48 h con 25.2%; 56 h con 33.3% y 72 h con 36.4%, se puede determinar la formación de las enzimas hidrolíticas formando parte del conjunto de metabolitos que participan en la degradación y que formar parte en detener la propagación del hongo (*Tabla 28*). Los miembros del género *Bacillus.sp* son los microorganismos beneficiosos más utilizados como bioplaguicidas para el control de enfermedades fúngicas.(146) Su efecto protector puede deberse a la presencia de diferentes mecanismos para influir negativamente, de forma directa o indirecta, en el crecimiento de patógenos. Varios autores han informado la actividad antagonista del género *Bacillus.sp* sobre diferentes hongos Fito patógenos lo que se atribuye a la producción de antibióticos

Los mayores valores del efecto antagónico de los aislados de *Bacillus.sp* frente a este hongo se obtienen en el menor tiempo probado (cuatro días), que podrían estar relacionados con el aumento de la producción de metabolitos anti fúngicos por parte de este inóculo y/o con la producción de compuestos por parte de la bacteria en el biorreactor que inhiban el crecimiento.

Tabla 28. Resumen de resultados obtenidos en los análisis de enzimas hidrolíticas y antagonismo.

Muestras(horas)	Producción de Celulasas	Producción de Amilasas	Producción de Proteasas	Producción de Quitinasas	Prueba de antagonismo
0	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
10	-	+	-	-	-
24	+	+	+	-	+
36	++	++	+	-	+
48	++	+++	++	-	++
56	+++	+++	+++	-	+++
72	++++	++++	++++	-	+++

Metabolitos positivos (+) y metabolitos negativos (-) *Tamaño de los halos de actividad:* (-) No se evidencia halo, (±) *Tamaño del halo < a 2mm*, (+) *Aproximado a 3 mm*, (++) *aproximado a 5mm*, (+++) *aproximado a 7mm*, (+++++) *aproximado a 11mm*, (+++++) *aproximado 12mm*.

El efecto obtenido por los aislados en el presente trabajo, debido a la presencia de diferentes sustancias metabólicas generadas en el fermentado de la bacteria con efecto de biocontrol, mostró antagonismo *in vitro* frente a la cepa del hongo *Rhizoctonia Solani* por medio de halos de inhibición formados reprimiendo su crecimiento de su micelio en el área total de la placa de cultivo, estos resultados son evidencia con los informados previamente por otros autores que coinciden como Yasmin et al. (147) Demostraron la capacidad de miembros del género *Bacillus.sp* de ejercer efecto biocontrolador inoculándolos con efecto de microorganismos antagonistas. Debido a que ciertas bacterias antagónicas se consideran agentes ideales de control biológico debido a su rápido crecimiento, fácil manejo y colonización agresiva de la rizosfera. Estas bacterias pueden mediar en el control biológico por uno o más de los diversos mecanismos de supresión de la enfermedad. Un mecanismo primario de inhibición de los patógenos es la producción de metabolitos secundarios y otros factores como la producción de las enzimas líticas también pueden desempeñar un papel de complemento en el proceso junto con otras sustancias como el cianuro microbiano. Estas bacterias están involucradas en el control biológico de enfermedades bacterianas, fúngicas y virales de las plantas. Los trabajos actuales sobre el efecto antagónico de algunos microorganismos una de las técnicas desarrolladas a partir de respuestas en germinación es llamado «priming y biopriming» como mecanismos de inducción de respuestas globales de la planta. Que se refiere a la manipulación del medio ambiente en crecimiento, antes y después del trasplante, En paralelo, las plantas en su medio ambiente natural está colonizado por muchas bacterias, hongos y micorrizas, *in vitro* o *ex vitro* de las plantas micropropagadas con tales organismos pueden mejorar la planta rendimiento en entornos de estrés, y en consecuencia mejora el rendimiento, los resultados indican un potencial prometedor para la diversificación de la industria mediante la producción de metabolitos útiles como subproductos.(148)

A diferencia del uso de los microorganismos directamente para estas funciones la desventaja es que estos necesitaran condiciones específicas para que se activen estas funciones favorables y cabe la posibilidad que no funcione en presencia de otros cultivos de los que no sean nativos. Dentro de la caracterización se logró identificar sustancias

producidas metabólicamente por la cepa con usos específicos, se podrá implementar a *Bacillus.sp* al cepario base para la formulación de los agentes biocontrol y PGP.

3.3. Conservación de metabolitos con actividad de promoción del crecimiento vegetal y antifúngica a nivel de invernadero

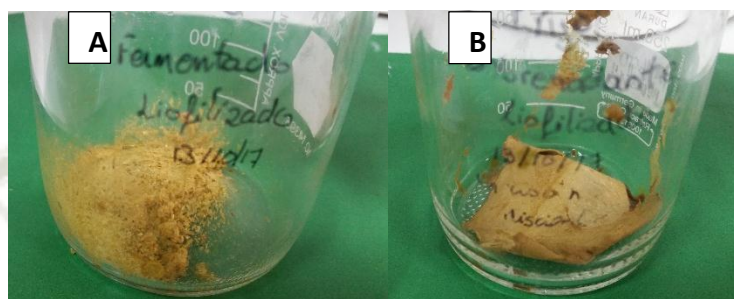


Figura 32. (A) muestra el resultado 6.53 g de liofilizado de 250 mL de fermentado. (B) muestra el resultado de 6.26 g de liofilizado de 250 mL del sobrenadante obtenido.

La Figura 32 representa el resultado obtenido después del proceso de liofilizado del fermentado y sobrenadante, teniendo una concentración de 26.12 g/L y 25.04 g/L respectivamente.

3.3.1. Parámetros Agronómicos e incidencia de la enfermedad

3.3.1.1. Evaluación de la Parte Aérea (masa foliar) de la plata de frijol



Figura 33. Comparación de la parte aérea de plantas de frijol con efecto de PGP por los tratamientos en conservación del fermentado de *Bacillus.sp*

En la imagen mostrada se observa de izquierda a derecha Ft.a (fermentado a temperatura ambiente); F 4 °C(fermentado a 4 °C); F-20 °C(fermentado a -20 °C); F lio (fermentado en estado de liofilización); St.a (Sobrenadante a temperatura ambiente); S 4°C(Sobrenadante a 4°C); S-20 °C(Sobrenadante a -20 °C); S lio (Sobrenadante en estado de liofilización);E-10(cepa *Rhizobium Etil-10*); H_2O (tratamiento blanco solo agua)

En la *Figura 33* permite observar el efecto de la aplicación de los tratamientos que muestran sobre la estimulación del crecimiento aéreo de la planta de frijol. Debido a la presencia de auxinas, y efecto de solubilización de fosfatos como principales factores que determinan el normal desarrollo de una planta, especialmente en ciertas partes de su ciclo de vida, como al inicio de su desarrollo y crecimiento cuando las plántulas son muy vulnerables y requieren de dosis de sustancias que mantengan su desarrollo normal. Estas actividades facilitan la asimilación de nutrientes y minerales del suelo, ayudando a la disminución de la actividad patogénica de organismos de la micro flora de la raíz y la síntesis de metabolitos bioestimuladores como AIA también da inicio a la producción de otras fitohormonas principalmente en una serie de procesos fisiológicos que incluyen el alargamiento y división celular, diferenciación de tejido, que propician el desarrollo vegetal, trae como consecuencia un mayor vigor de las plantas, así como también el incremento del desarrollo radical, lo cual genera un aumento en la captación y aprovechamiento de agua por las raíces debido a que ocurre una mayor exploración del suelo(149).

Dicho esto, se observa que los tratamientos de mejor aspecto foliar de frijol son los F-20°C, F lio, S-20°C y S lio por el número de hojas el tamaño y color que presenta la planta frijol en comparación con el tratamiento control positivo con el *Rhizobium* E-10 son similares de forma positiva mientras que los otros tratamientos incluido el blanco solo en agua se observa menos hojas, menor tamaño, menos peso y clorosis pronunciada en la mayoría de su área.

Se seleccionó cuatro de las repeticiones por cada tratamiento en conservación utilizado tanto del sobrenadante como del fermentado aplicado a las plántulas de frijol de 12 días de sembrado, ya mencionados en invernadero (*Anexo 4*), se les colocó una semillas de trigo usado como soporte de *Rhizoctonia solani* (patógeno, P) proveniente de un cultivo en medio PDA, dentro del sustrato a unos 3 cm de cada planta envainadora, tan profundo como fue posible, sin dañar a la planta. Se procedió a humedecer la zona de inoculación con agua estéril para evitar la intervención de cualquier otro sustancia o microorganismo y para mantener una alta humedad relativa en el mismo y favorecer el desarrollo de la enfermedad. Se evaluó la incidencia de

plantas infectadas por *R. solani*. Representado el estado de estos (Figura 34). Presentan diferencias en el área foliar un mejor aspecto las plantas con el tratamiento a conservación a -20°C y liofilizado tanto del sobrenadante y fermentado los en comparación con el control químico que no tiene efecto del hongo siendo u toxico más eficiente, mientras que los otros tratamientos el hongo es mucho más invasivo en la planta insidiendo a la perdida y resecaamiento de muchas hojas.



Figura 34. Comparación de la parte aérea de la planta de frijol con efecto antagónico de los tratamientos frente al hongo *Rhizoctonia solani*.

En la imagen mostrada se observa de izquierda a derecha Ft.a (fermentado a temperatura ambiente); F 4°C (fermentado a 4°C); F -20°C (fermentado a -20°C); F lio (fermentado en estado de liofilización); St.a (Sobrenadante a temperatura ambiente); S 4°C (Sobrenadante a 4°C); S -20°C (Sobrenadante a -20°C); S lio (Sobrenadante en estado de liofilización); PA (patógeno); CQ (control químico)

La Tabla 29 muestra un resumen de los valores promedio resultantes de la evaluación del tamaño desarrollado por el tallo desde el cuello de la raíz hasta su ápice y los valores del peso fresco y seco de toda el área foliar de la planta de frijol, comparando todos los tratamientos donde se remarcan los tratamientos con mayores cifras de color rojo y los controles de color azul, los restantes mostraron ser menores y/o similares entre sí.

Los resultados obtenidos de acuerdo al análisis de varianza en comparación de los tratamientos con los parámetros evaluados, se podría decir que las diferencias registradas fue debido a las condiciones de los inóculos en los tratamientos que fueron sometidos por un mes a un estado de conservación en frío diferente, en donde sus componentes presentan alta significancia destacando principalmente el efecto PGP

que mantiene a la planta en su crecimiento sin intervención de ninguna otra sustancias como soluciones hidropónicas enriquecidas y la resistencia a la incidencia del patógeno brindándole protección a la planta buscando tener efectos que puedan reemplazar a los químicos como fungicidas, en los que vemos resaltar los tratamientos sometidos a conservación de -20°C y liofilizado.

Tabla 29. Efecto metabólico a diferentes temperaturas de conservación.

TRATAMIENTO	ALTURA (cm)	PESO FRESCO (g)	PESO SECO (g)
Fta	14.58 ± 2.11 ABCD	7.90 ± 2.40 ABCDE	0.73 ± 0.33 ABC
F4C	16.13 ± 0.65 BCD	9.10 ± 1.50 DE	0.87 ± 0.20 ABC
F-20C	17.25 ± 0.80 D	8.69 ± 1.76 BCDE	1.01 ± 0.19 BC
F lio	16.83 ± 1.44 CD	9.50 ± 1.73 E	1.11 ± 0.32 ABC
S ta	15.35 ± 1.03 ABCD	6.80 ± 2.06 ABCDE	0.73 ± 0.26 ABC
S 4C	15.7 ± 0.98 ABCD	7.86 ± 1.38 ABCDE	0.91 ± 0.15 ABC
S -20C	16.56 ± 1.15 CD	9.53 ± 1.49 CDE	1.18 ± 0.30 ABC
S lio	17.15 ± 1.08 D	10.24 ± 1.04 E	1.43 ± 0.37 BC
E10	15.62 ± 1.53 BCD	9.58 ± 1.68 E	1.12 ± 0.19 C
H2O	15.08 ± 0.62 ABCD	8.52 ± 1.20 ABCDE	1.03 ± 0.23 ABC
F ta Pat	14.31 ± 1.05 ABCD	5.17 ± 3.25 ABDCE	0.85 ± 0.17 ABC
F 4C Pat	15.36 ± 2.64 ABCD	3.59 ± 1.44 AB	0.84 ± 0.19 ABC
F -20C Pat	17.00 ± 2.08 D	6.71 ± 4.16 ABCDE	1.03 ± 0.26 BC
F lio Pat	15.32 ± 1.17 ABCD	6.11 ± 3.34 ABCDE	0.93 ± 0.21 ABC
S ta Pat	12.68 ± 3.27 ABC	3.48 ± 0.90 A	0.69 ± 0.29 AB
S 4C Pat	13.63 ± 3.49 ABCD	5.89 ± 3.64 ABCDE	0.80 ± 0.29 ABC
S -20C Pat	13.68 ± 4.29 ABCD	6.97 ± 5.01 ABCDE	0.90 ± 0.19 ABC
S lio Pat	12.12 ± 3.48 AB	5.57 ± 2.03 ABC	0.84 ± 0.23 BC
PA	11.90 ± 2.92 A	4.10 ± 2.96 ABCD	0.58 ± 0.20 A
CQ	14.59 ± 1.20 ABCD	7.51 ± 2.46 ABCDE	0.94 ± 0.29 ABC

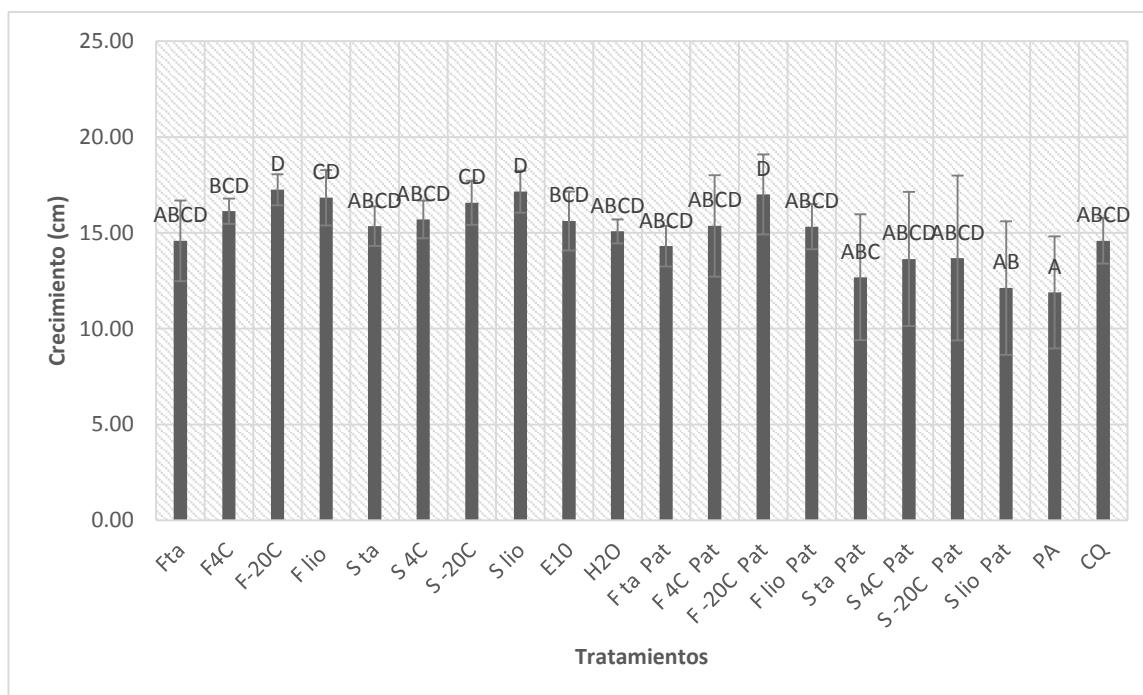


Figura 35. Comparación de los valores de altura de la parte aérea de la plata de frijol obtenidos en los 20 tratamientos, aplicados en el experimento con evaluación para PGP y PGP + Patógeno, frente a dos controles (E-10 y C. Químico)

La Figura 35 muestra la diferencia estadística de altura para cada uno de los 20 niveles de Tratamientos. La intención principal del análisis de varianza de un factor es la de comparar las medias de los diferentes niveles, enlistados aquí bajo la columna de promedio. Entre los tratamientos la diferencia significativa no es muy grande en este parámetro por lo que las desviaciones estándar se ven descubiertas a una diferencia de más de 3 a 1 entre la desviación estándar más pequeña y la más grande. Esto puede causar problemas puesto que el análisis de varianza asume que las desviaciones estándar de todos los niveles. Pero aun así se observa una diferencia no significativa con un promedio mayor de peso de los tratamientos de sobrenadante y fermentado con la temperatura de conservación de -20°C y liofilizado, en comparación con los otros tratamientos, de igual manera para los de control patógeno

Al tener peso fresco aéreo y peso seco no difieren con los resultados al comparar las variedades de los tratamientos probados sobre la planta de frijol. En la *Figura 36* se observa que para el peso fresco del área foliar, S lio (sobrenadante liofilizado) muestra un valor superior 10.24 g de promedio de todas las repeticiones. También esta misma variedad se mantiene por encima para el peso seco aéreo (1.43 g/planta) (*Figura 37*)

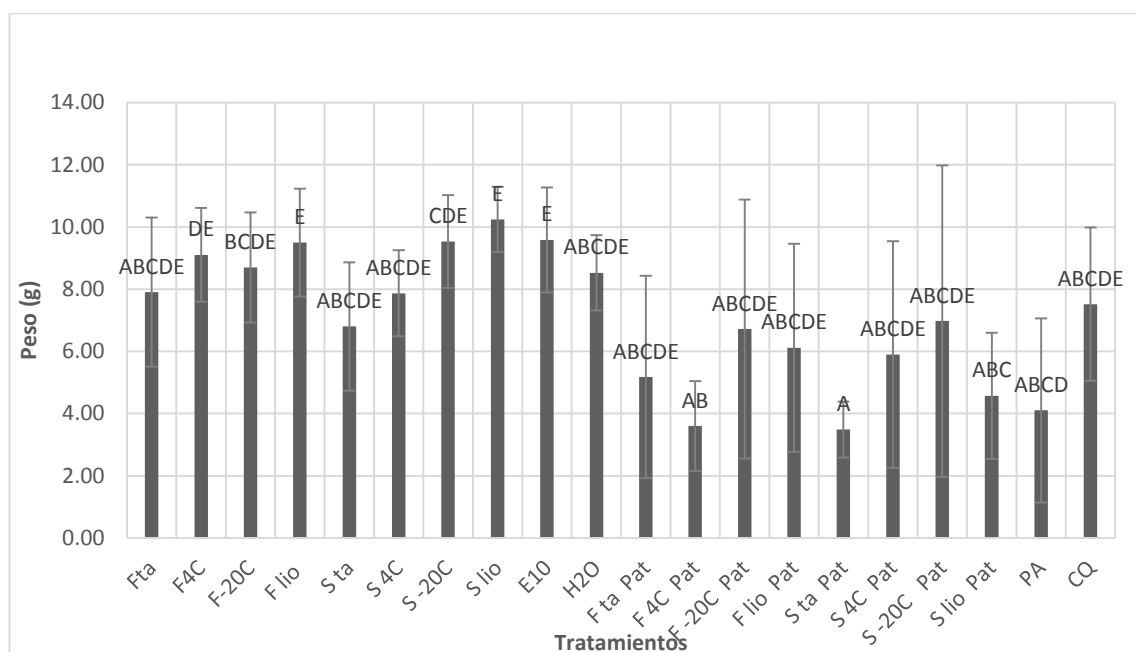


Figura 36. Comparación de los valores de peso fresco de la parte aérea de la planta de frijol obtenidos en los 20 tratamientos, aplicados en el experimento con evaluación para PGP y PGP + Patógeno, frente a dos controles (E-10 y Químico)

Para ambos pesos (fresco y seco) se tiene que las temperaturas de conservación de los metabolitos dieron diferencias en la evaluación se ven efectos crecientes de acuerdo a las temperaturas, teniendo menor rendimiento las de conservación a temperatura ambiente, mientras que conforme baja la temperatura de conservación al frío es decir de 4°C a -20°C grados los efectos son más favorables en cuanto a la biomasa foliar de la planta y mejor resultado a la conservación presenta el sistema por liofilizado, estos resultados para el grupo de plantas de solo la evaluación de PGP, Por otro lado se tiene el lote de plantas con estos tratamientos pero más la incidencia de la inoculación del patógeno *Rhizoctonia solani*, teniendo aun así el control químico (CQ)

muy superior aun a los demás extractos, pero representando a su mayor proximidad los tratamientos de F-20°C PAT, Flio PAT, S -20°C PAT y Slio PAT con respecto a su eficiencia de biocontrol frente al estado de la planta como se representa en la *Figura 37*.

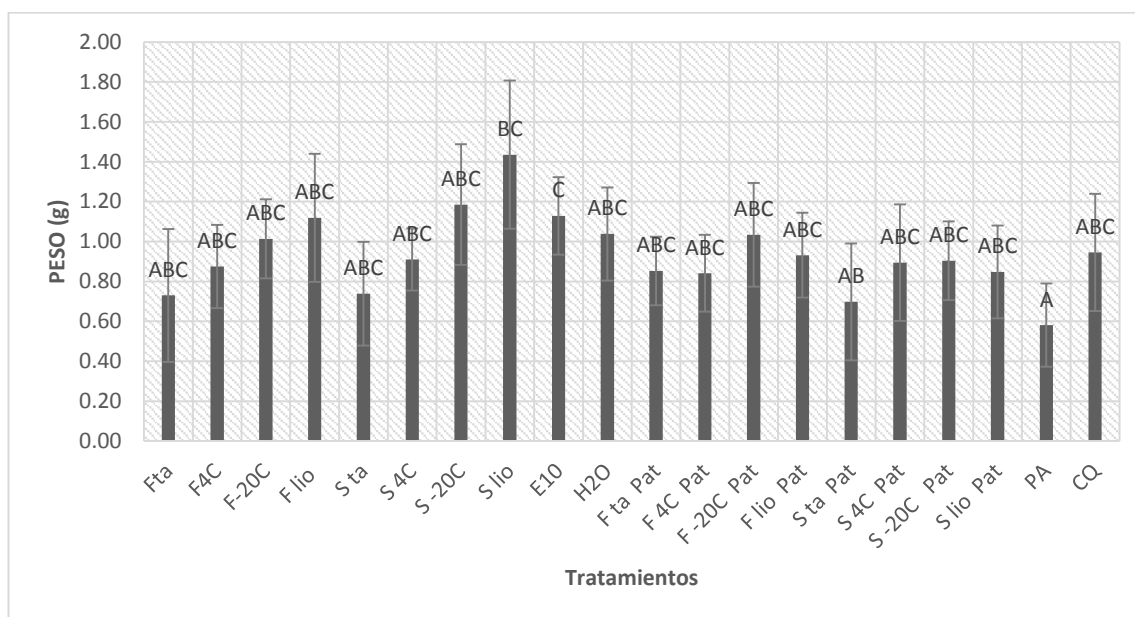


Figura 37. Comparación de los valores de peso seco de la parte aérea de la plata de frijol obtenidos de los 20 tratamientos aplicados en el experimento con evaluación para PGP y PGP + Patógeno, frente a dos controles (E-10 y Químico)

Para la evaluación de la parte aérea de la panta es posible que se hubieran apreciado más resultados y diferencias, si el frijol hubiera llegado a la fase productiva debido a que la intervención de los inóculos quizás hubiera intervenido en el número y/o características de las vainas por plantas y semillas por vaina. Por otra parte, es que queda indicado que en las condiciones en las que se encontraba la planta de leguminosa es afectada negativamente para llegar al final de su desarrollo por la deficiencia de enriquecerla con solución nutritiva y por la incidencia del hongo, la ausencia de esta probara mejor la actividad de los inóculos provenientes del extractos de metabolitos de la bacteria y por lo que se ha demostrado en este ensayo, la planta es capaz de expresar por si misma todo su potencial en estas condiciones y por extensión la interacción entre planta y sustancias metabólicas con respuesta a conservación a la que fue expuesta.

3.3.1.2. Evaluación de la Parte Raíz de la planta de frijol



Figura 38. Raíz de plantas de frijol con efecto de PGP de los tratamientos.

En la imagen mostrada se observa de Izquierda a derecha, Ft.a (fermentado a temperatura ambiente); F 4°C(fermentado a 4°C);F-20°C(fermentado a -20°C);F lio (fermentado en estado de liofilización); St.a (Sobrenadante a temperatura ambiente);S 4°C(Sobrenadante a 4°C);S-20°C(Sobrenadante a -20°C);S lio (Sobrenadante en estado de liofilización);E-10(cepa *Rhizobium Etil-10*); H₂O (tratamiento blanco solo agua)

El experimento evidenció el efecto significativo que tiene el cóctel de metabolitos. En la *Figura 38* representa el volumen radicular que género con cada uno de los tratamientos junto con la promoción de crecimiento, se puede observar en los resultados del lote de plantas para PGP que los tratamientos de conservación a temperatura ambiente y 4°C el volumen de raíz es menor, mientras que para los tratamientos a -20°C y liofilizado se encuentran en mejor estado y con presencia de nódulos radiculares con buen respuesta en comparación en el efecto del control E-10.

Las plantas que presentan por complicaciones o reducción en crecimiento tanto de raíz y área foliar, se le puede atribuir dificultades futuras a una alteración a la absorción en la tasa fotosintética y modificación en el metabolismo y su posterior distribución que la producción de biomasa y relación raíz/follaje son criterios comúnmente utilizados, para seleccionar individuos que puedan resistir a condiciones diferentes de suelo como tolerancia a condiciones extremas (150).

Por otra parte, las variables de evaluación de la raíz como su longitud, peso fresco y seco se vio afectado de manera notoria, por la infección del hongo inoculado *Rhizoctonia solani* en ambas áreas, viendo una pudrición en la raíz que con frecuencia afecta en las plántulas induce muerte. Las lesiones son ovales, hundidas, de color café rojizo y aspecto seco en los tejidos. Se observa flacidez del follaje y posteriormente el secamiento total por la deficiencia de nutrientes debido al bajo transporte de nutrientes y asimilación por parte de la raíz y una avanzada podredumbre del tejido de raíz, por lo que se ve presente una clorosis (Figura 39) destruyendo las células vegetales e inhibiendo la síntesis de hormonas, lo que limita el crecimiento de la planta.

El daño inducido por *R. solani* es más severo en las primeras etapas de desarrollo de las plantas (Figura 39)



Figura 39. Raíz de plantas de frijol con efecto antagónico de los tratamientos frente el hongo *Rhizoctonia solani*.

En la imagen mostrada se observa de izquierda a derecha Ft.a (fermentado a temperatura ambiente); F 4°C(fermentado a 4°C); F-20°C(fermentado a -20°C); F lio (fermentado en estado de liofilización); St.a (Sobrenadante a temperatura ambiente); S 4°C(Sobrenadante a 4°C); S-20°C(Sobrenadante a -20°C); Slio (Sobrenadante en estado de liofilización); PA(patógeno); CQ(control químico)

Tabla 30. Efecto metabólico a diferentes temperaturas de conservación sobre la raíz de la planta de frijol

TRATAMIENTO/(mm)	Largo de Raíz (cm)	Raíz peso fresco (g)	Raíz peso seco (g)
Fta	13.33±2.06 A	6.80±2.6 ABCD	0.56±0.22 ABCD
F4C	14.16± 1.83 A	7.56 ±2.9 ABCD	0.74± 0.17 ABCD
F-20C	16.16± 1.32 A	9.28 ± 3.43 D	0.94±0.31 BCDE
F lio	16± 0.89A	7.04 ± 1.12ABCD	0.94± 0.41 ABCDE
S ta	12.83±2.7 A	8.59± 2.11 ABCD	0.72±0.24 ABCD
S 4C	14.28± 1.83 A	9.39± 2.07 D	1.00±0.46 CDE
S -20C	17.46±2.17 A	9.37±2.07 D	1.46± 0.43 E
S lio	16.56± 1.49 A	9.22± 2.4 D	0.66±0.22 ABCD
E10	17.4±4.42 A	5.78± 2.7 ABCD	0.58± 0.23 ABCD
H2O	16.45±4.6 A	8.31 ± 1.80CD	0.56±0.12 ABC
F ta Pat	8.98± 2.2 A	3.76 ±3.04 AB	0.46±0.31 ABC
F 4C Pat	10.07±1.8 A	3.67 ±0.66 A	0.34± 0.14 A
F -20C Pat	12.63± 1.5 A	7.03 ±2.01 ABCD	0.65± 0.49 ABCD
F lio Pat	13.62±4.0 A	8.27±1.84 BCD	0.74± 0.26 ABCD
S ta Pat	9± 2.67 A	4.1 ± 2.57 ABC	0.43± 0.28 ABC
S 4C Pat	12.81±4.0 A	7.24 ±4.71 ABCD	0.66± 0.37 ABCD
S -20C Pat	12.5± 2.20A	5.69 ± 1.90 ABCD	0.58± 0.25 ABCD
S lio Pat	11.85± 3.5A	6.52 ±1.91 ABCD	1.08±0.50 DE
PA	16.66±7.8 A	4.46 ±2.10 ABC	0.37±0.12 AB
CQ	16.48±5.7 A	6.58± 3.29 ABCD	0.55±0.23 ABC

En la *Tabla 30* se observa los valores promedio de los tres primeros parámetros agronómicos evaluados en la raíz, comparando todos los tratamientos donde se remarcen los tratamientos con mayores cifras de color rojo y los controles de color azul, los restantes mostraron ser menores y/o similares entre sí. *Bacillus.sp* estudiado en el incremento de la nodulación (*Tabla 31*) Se encontraron diferencias significativas en todos los parámetros evaluados (*Tabla 30 y 31*), tanto en la biomasa de los nódulos como en su peso seco (*Figura 43*), dando notar el estado y efecto en que se encuentra cada uno de las porciones de inóculo en este caso mayor conservación tanto del aspecto en cantidad de la raíz y nódulos se encuentra al sobrenadante llevado a liofilización utilizado (S lio) y (F lio) el cual en comparación con el potencial efecto del *Rhizobium* E-10 utilizado como control positivo se encuentran con similitud de datos. Mientras los otros tratamientos como el sobrenadante y fermentado a 4°C y temperatura

ambiente al ser comparados con el aspecto de la parte aérea de la planta se encuentran en una disminución en los valores numéricos de la biomasa aérea y radicular.

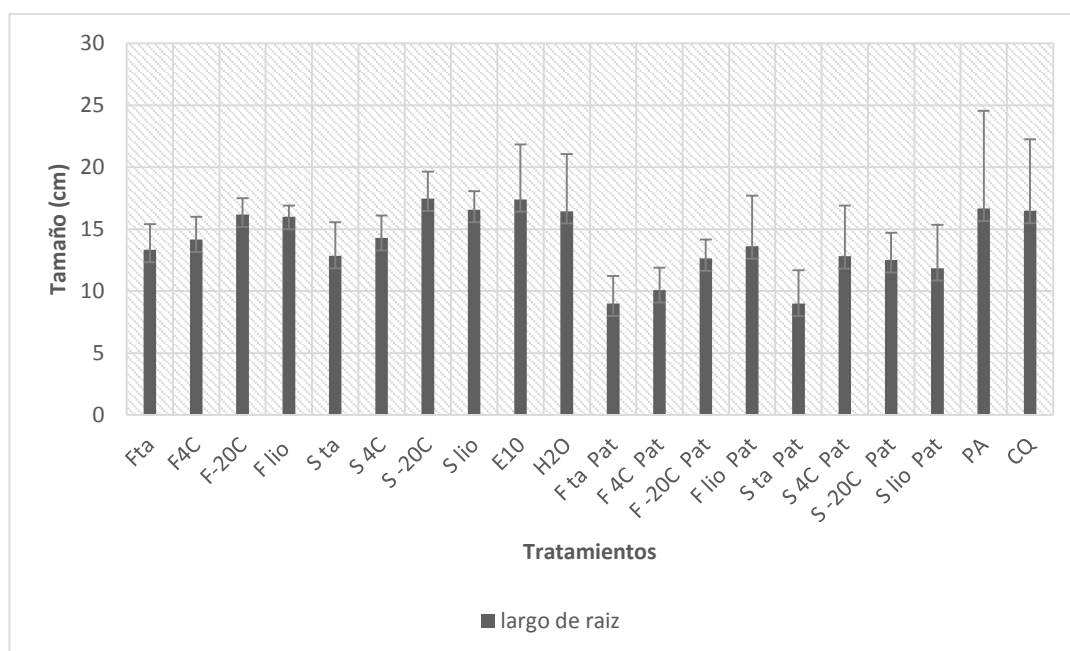


Figura 40. Análisis del tamaño de raíz obtenido en cada tratamiento del fermentado y sobrenadante a diferentes temperaturas de conservación en la planta de frijol.

La variable longitud de raíz (*Figura 40*) presentó un valor máximo de 17.56 ± 2.17 cm, que correspondió al tratamiento de S -20°C, mientras en los tratamientos de 4°C y temperatura ambiente son los más bajos, teniendo de igual manera el mejor resultado en la variable de peso seco de la raíz tanto para la promoción de crecimiento como para la incidencia del patógeno (*Figura 42*) un mejor resultado tanto en el fermentado como en el sobrenadante en estado de conservación de congelado a -20°C y de liofilizado. Nuevamente el rendimiento de los tratamientos inoculados superó significativamente al control sin inocular, pero fue inferior al control inoculado con el control químico. A pesar de que las consideraciones anteriores podrían explicar nuestros resultados, los mismos parecen no ser consistentes con el desarrollo radical observado ya que, las plantas tratadas con el inoculo a S -20°C y S lio mostraron los mayores valores de biomasa radical (*Figura 41*) con lo cual este grupo debió ser el que mostrara el mayor potencial; así, las diferencias en el estado de las plantas no pueden ser atribuidas en su totalidad al crecimiento radical.

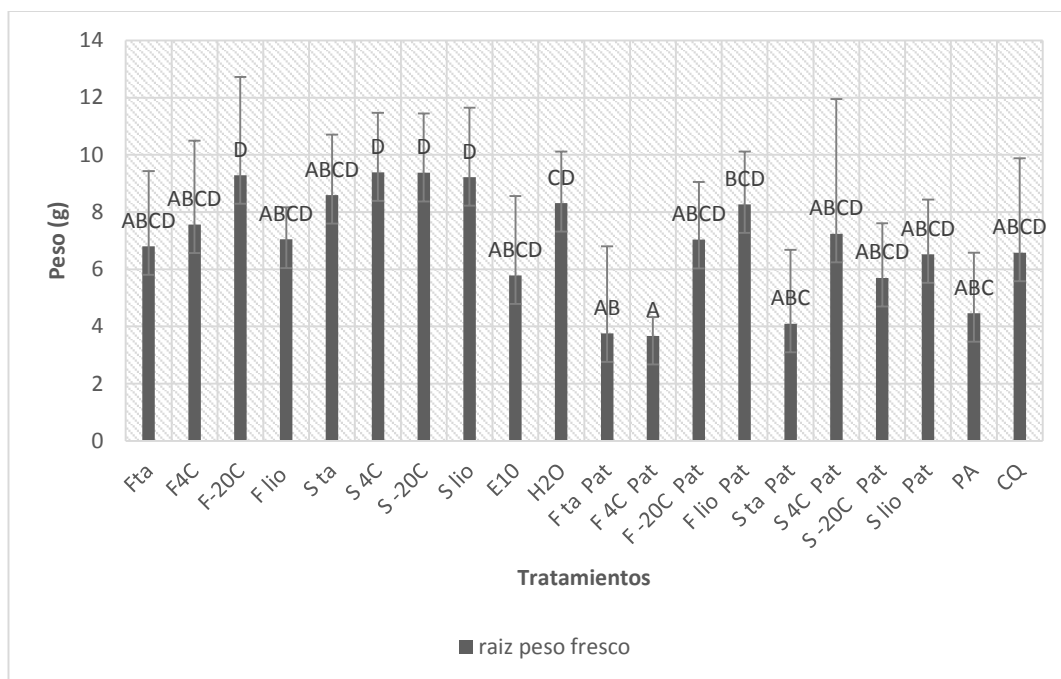


Figura 41. *Peso de raíz obtenido en cada tratamiento del fermentado y sobrenadante a diferentes temperaturas de conservación en la planta de frijol.*

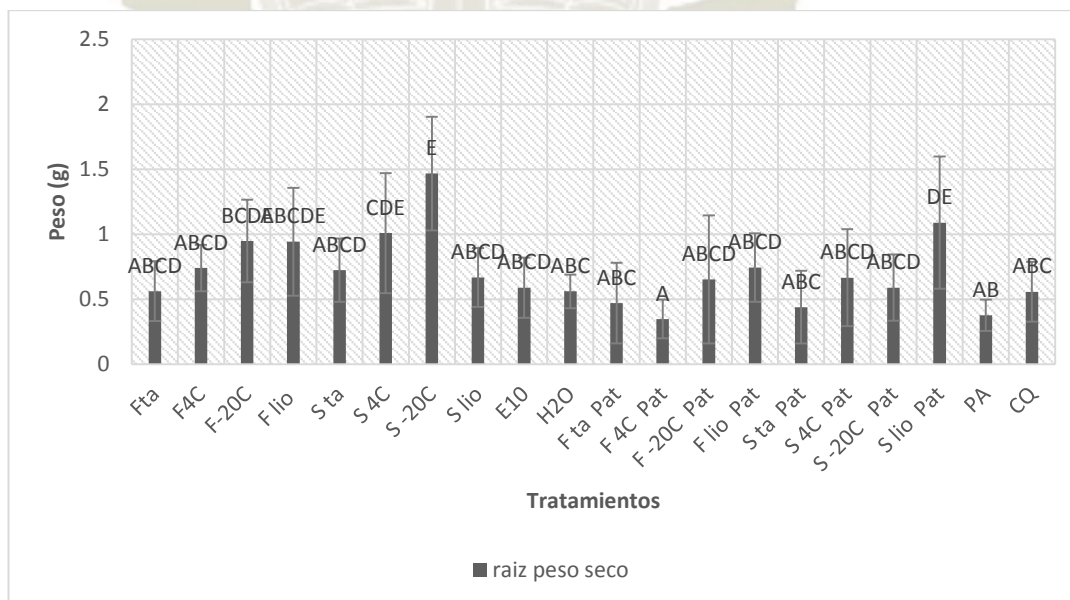


Figura 42. *Peso seco de raíz obtenido en cada tratamiento del fermentado y sobrenadante a diferentes temperaturas de conservación en la planta de frijol.*

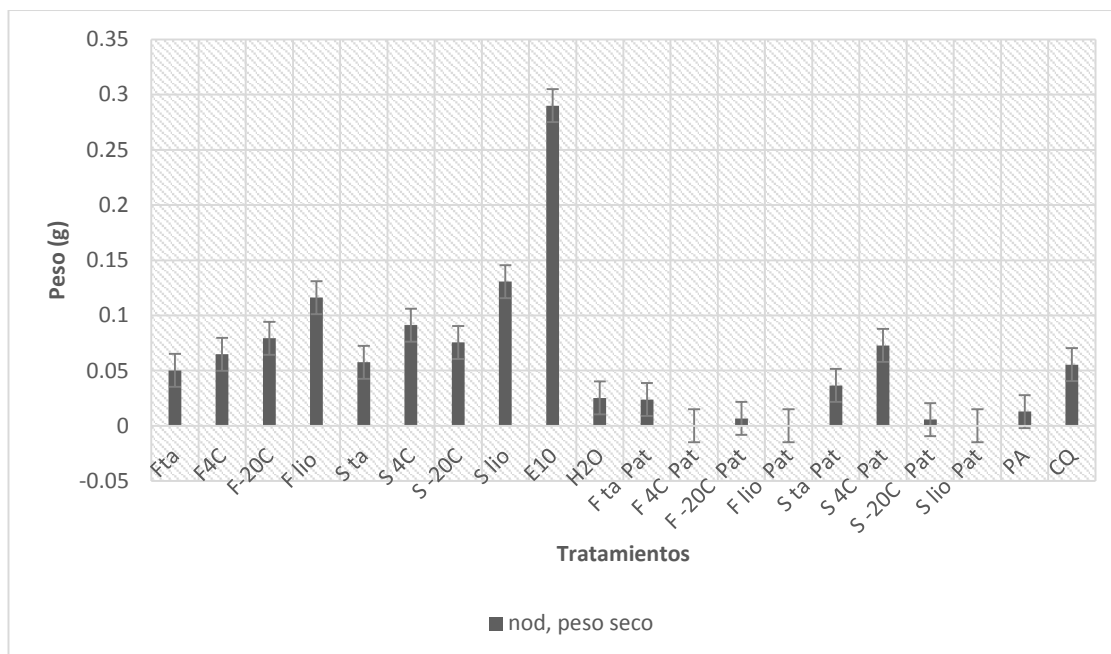


Figura 43. *Peso seco de nódulos obtenido en cada tratamiento del fermentado y sobrenadante a diferentes temperaturas de conservación en la raíz de la planta de frijol.*

En la *Tabla 31* se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las letras en mayúscula representando la posición de X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de letras. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla 31. Efecto metabólico a diferentes temperaturas de conservación sobre la raíz de la planta de frijol diferenciando la presencia nodular e incidencia de la enfermedad del hongo.

TRATAMIENTO	Nódulos (g)	Nod, peso seco(g)	Incidencia
Fta	0.29± 0.69 A	0.05± 0.28 AB	0
F4C	0.33±0.80 A	0.06± 0.31 AB	0
F-20C	0.21± 0.17 A	0.07±0.17 AB	0
F lio	0.34±0.46 A	0.11± 0.46 AB	0
S ta	0.09±0.09 A	0.05±0.09 A	0
S 4C	0.26±0.59 A	0.09± 0.20 AB	0
S -20C	0.27±0.30 A	0.07± 0.07 AB	0
S lio	0.15±0.20 A	0.13± 0.05 A	0
E10	1.143±0.47 B	0.28±0.20 B	0
H2O	0.24±0.25 A	0.02±0.02 A	0
F ta Pat	0.14±0.26 A	0.023±0.04 A	8.25± 1.03 CD
F 4C Pat	0	0	9± 0 D
F -20C Pat	0.03± 0.09 A	0.006±0.01 A	7.25±1.28 BC
F lio Pat	0	0	7.25±0.70 BC
S ta Pat	0.04±0.08 A	0.03± 0.09 A	8.25±1.03 CD
S 4C Pat	0.16± 0.23A	0.07±0.18 AB	8.5± 0.92 CD
S -20C Pat	0.05±0.07 A	0.005±0.008 A	8.25±1.03 CD
S lio Pat	0	0	6.5±0.92 B
PA	0.13± 0.06A	0.012± 0.007 AB	8.2± 1.39 CD
CQ	0.42± 0.71 A	0.05± 0.10 A	0±0 A

En la Tabla 32 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 17 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 32. Comparación múltiple de incidencia de enfermedad causada por *Rhizoctonia solani*.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
CQ - F -20C Pat	*	-7.25	1.4762
CQ - F 4C Pat	*	-9.0	1.4762
CQ - F lio Pat	*	-7.25	1.4762
CQ - F t.a Pat	*	-8.25	1.4762
CQ - PA	*	-8.11111	1.42992
CQ - S -20C Pat	*	-8.25	1.4762
CQ - S 4C Pat	*	-8.5	1.4762
CQ - S lio Pat	*	-6.5	1.4762
CQ - S t.a Pat	*	-8.25	1.4762
F -20C Pat - F 4C Pat	*	-1.75	1.55605
F -20C Pat - F lio Pat		0	1.55605
F -20C Pat - F t.a Pat		-1.0	1.55605
F -20C Pat - PA		-0.861111	1.51221
F -20C Pat - S -20C Pat		-1.0	1.55605
F -20C Pat - S 4C Pat		-1.25	1.55605
F -20C Pat - S lio Pat		0.75	1.55605
F -20C Pat - S t.a Pat		-1.0	1.55605
F 4C Pat - F lio Pat	*	1.75	1.55605
F 4C Pat - F t.a Pat		0.75	1.55605
F 4C Pat - PA		0.888889	1.51221
F 4C Pat - S -20C Pat		0.75	1.55605
F 4C Pat - S 4C Pat		0.5	1.55605
F 4C Pat - S lio Pat	*	2.5	1.55605
F 4C Pat - S t.a Pat		0.75	1.55605
F lio Pat - F t.a Pat		-1.0	1.55605
F lio Pat - PA		-0.861111	1.51221
F lio Pat - S -20C Pat		-1.0	1.55605
F lio Pat - S 4C Pat		-1.25	1.55605
F lio Pat - S lio Pat		0.75	1.55605
F lio Pat - S t.a Pat		-1.0	1.55605
F t.a Pat - PA		0.138889	1.51221
F t.a Pat - S -20C Pat		0	1.55605
F t.a Pat - S 4C Pat		-0.25	1.55605
F t.a Pat - S lio Pat	*	1.75	1.55605
F t.a Pat - S t.a Pat		0	1.55605
PA - S -20C Pat		-0.138889	1.51221
PA - S 4C Pat		-0.388889	1.51221
PA - S lio Pat	*	1.61111	1.51221

PA - S t.a Pat		-0.138889	1.51221
S -20C Pat - S 4C Pat		-0.25	1.55605
S -20C Pat - S lio Pat	*	1.75	1.55605
S -20C Pat - S t.a Pat		0	1.55605
S 4C Pat - S lio Pat	*	2.0	1.55605
S 4C Pat - S t.a Pat		0.25	1.55605
S lio Pat - S t.a Pat	*	-1.75	1.55605

* Indica una diferencia significativa.

Los resultados del trabajo demuestran la mejora de algunas características en plantas de frijol como el crecimiento vegetativo y de raíz, en el efecto de biocontrol retarda la incidencia del hongo patógeno *Rhizoctonia solani* y la agresión de ataque con respecto a la infección, cuando las plantas son inoculadas con los tratamientos, el que mayor efecto tuvo sobre el patógeno fue tanto el fermentado como el sobrenadante sometido a conservación por liofilizado (*Figura 44*), aunque no hubo diferencias significativas con los otros tratamientos a diferentes temperaturas en efecto en las plantas en las que fueron inoculadas, mostrando un índice porcentual del 100% de incidencia del total de las plantas infectadas, de acuerdo a la fórmula de Van der Plank (1975) en Principles of Plant Infección, en comparación con el control químico de la incidencia sobre *R. solani* fue más acentuado el efecto atenuando casi en totalidad su infección, de esta forma, los resultados sugieren que para tener un efecto integral sobre plantas de frijol, se podría establecer un patrón de re inoculación de los tratamientos, debido al efecto complementario en que actúa reduciendo el crecimiento del micelio.

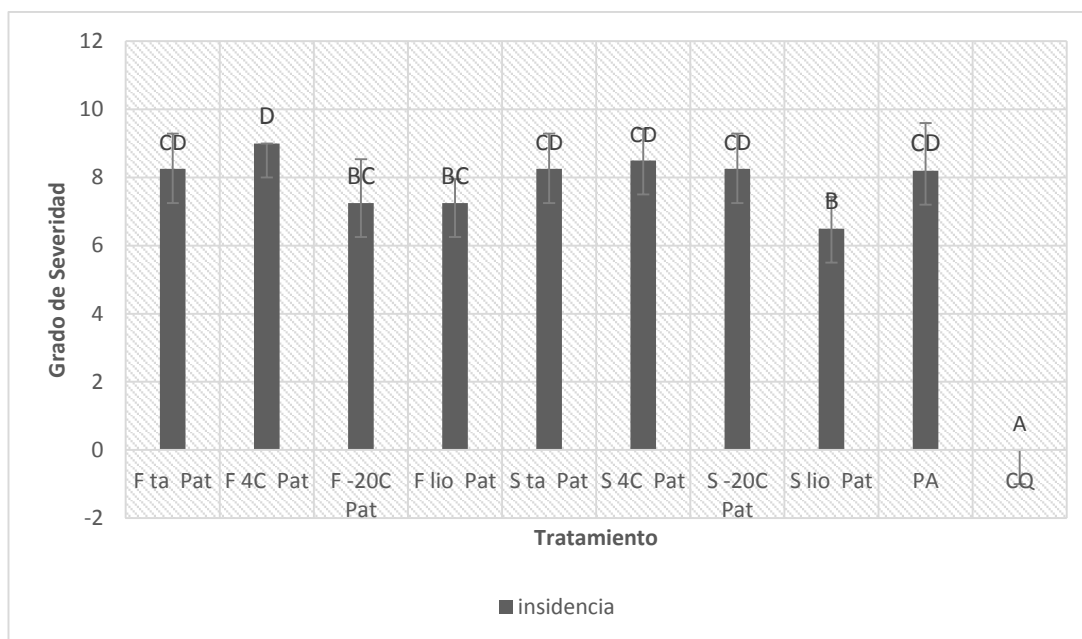


Figura 44. Grado de severidad de la Incidencia del hongo (*Rhizoctonia solani*) obtenido en cada tratamiento del fermentado y sobrenadante a diferentes temperaturas de conservación en la planta de frijol.

Los resultados obtenidos de los parámetros agronómicos: tamaño de la planta, raíz, peso seco y fresco de la plántula de frijol, nos demostraron que existe diferencias significativas estadísticamente comparadas con los controles, lo que denota la relación con la producción de sustancias promotoras de crecimiento vegetal que activan varias respuestas en el desarrollo de las células vegetales, a nivel fisiológico, nivel bioquímico y nivel morfológico, de igual manera en respuesta con otras semillas de hortalizas no leguminosas para la potencia de una semilla vigorosa de buena calidad, en lo que se vería una buena biomasa vegetativa.

Por el otro lado el efecto de los inóculos para con la incidencia del hongo no se ve un efecto eficiente en comparación con el control químico, solo muestra un control mínimo mas no su eliminación total de la infección se puede ver que debe requerir quizás de una mayor concentración de enzimas hidrolíticas que podría ser medida en dosificaciones o también actuar en conjunto con otros componentes de actividad antifúngica.

4. CONCLUSIONES

1. El fermentado producido por la cepa *Bacillus.sp*, en evaluaciones *in vitro*, dio positivo las pruebas de presencia de ácido indol acético y para solubilización de fosfatos, resultados que aportara a la acción de promoción de crecimiento vegetal (PGP), la acción de los inóculos en semillas en el periodo de germinación no presento toxicidad, se observó en el crecimiento de hipocótilo e incremento de pelos radiculares con respecto del control testigo. El inóculo del sobrenadante favoreció en las semillas tanto de frijol, rabanito y brócoli un mayor desarrollo de pelos radiculares dándole mayor volumen y área de adsorción a la raíz de la futura planta, en las semillas de tomate y lechuga los efecto fueron menores.
2. La evaluación *in vitro* de enzimas hidrolíticas resulto positivo para Celulasas, Amilasas y Proteasas, mientras que para Quitinasas fue Negativo, obteniendo en el Bioensayo de Biocontrol los halos de inhibición de crecimiento frente el hongo *Rhizoctonia solani*.
3. Existió una respuesta significativa en las plantas de frijol, lo que indica una influencia marcada de las características de las plantas en dichas variables por los tratamientos, los resultados demostraron que las plantas inoculadas con el sobrenadante de temperatura de conservación a -20°C y Liofilizado, presentaron mayor promedio en altura del tallo, longitud de raíz, peso seco y un notable desarrollo vegetativo de la planta.

5. RECOMENDACIONES

- Incursionar en la búsqueda de más de compuestos producidos por el género *Bacillus.sp*, al mismo tiempo, es necesario realizar experimentos en condiciones de campo, para evaluar la interacción con los microorganismos y sustancias en el suelo.
- Hoy en día también se están investigando cepas bacterianas modificadas genéticamente que mejoran e incluso potencian la acción e interacción con las plantas, habiendo encontrado una cepa bacteriana que posee la capacidad de producir más de un metabolito beneficioso, se podría obtener consorcios de bacterias agrupadas por la producción potencial de un metabolito en específico facilitando la purificación del compuesto.
- Se hace necesario explorar alternativas agroindustriales, que permitan conservar sus propiedades funcionales de aplicación.
- Las enzimas obtenidas también pueden ser utilizadas en la industria de detergentes, industria del cuero, entre otras.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). Exportaciones de legumbres alcanzarán los US\$ 80 millones al cierre del 2017.
2. Ortuño N, Miranda C, Claros M. Selección de cepas de *Trichoderma* spp. generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. *J Selva Andina Biosphere*. 2013;1(1):16–32.
3. Cano MA. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. *Rev UDCA Actual Amp Divulg Científica*. 2011 Dec; 14(2):15–31.
4. Tejera-Hernández B, Rojas-Badía MM, Heydrich-Pérez M. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Rev CENIC Cienc Biológicas*; 42(3).
5. Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai W-A, Young CC. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl Soil Ecol*. 2006 Nov 1; 34(1):33–41.
6. Ooi TC, Ariff A, Mohd Saud H, Shamsuddin Z. Growth kinetics of diazotrophic *Bacillus sphaericus* UPMB10 cultured using different types and concentrations of carbon and nitrogen sources. *Malays J Microbiol*. 2008;4(2):15–25.
7. Figueiredo MVB, Martinez CR, Burity HA, Chanway CP. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World J Microbiol Biotechnol*. 2008 Jul 1;24(7):1187–93.
8. Han J s., Cheng J h., Yoon T m., Song J, Rajkarnikar A, Kim W g., et al. Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. sunhua. *J Appl Microbiol*. 2005 Jul 1;99(1):213–21.
9. Bashan Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol Adv*. 1998 Jul 1;16(4):729–70.
10. Marinelli F, Molinari F. Las fermentaciones en la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico. *Monogr Real Acad Nac Farm*. 2011 Mar; 61-124.

11. Demain AL, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. J Antibiot (Tokyo). 2009 Jan; 62(1):5–16.
12. Bobadilla Henao C, Vanegas R, Carolina S. Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. 2014 May 7:14-97
13. Lara CC, Oviedo L, Aleman A. Aislados nativos con potencial en la producción de ácido indol acético para mejorar la agricultura. 2011 Jul 1;9(1):17–23.
14. Guzmán H, Andrea P. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios detectados por fermentación en medio líquido de aspergillus.sp nativo del páramo de cruz verde. 2014 Apr 3:11-35
15. Davis JR, Groskopp MD. Influences of the Rhizoctonia disease on production of the Russet Burbank potato. Am Potato J. 1979 May 1;56(5):253–64.
16. Torres S, Alexandra V. Determinación del antagonismo in vitro de Bacillus SPP. Aislado del suelo de los cultivos de banano de la región costa del Ecuador frente al hongo Fitopatógeno Fusarium OxysporumFf. SP. Cubense raza tropical Pontif Univ Católica Ecuad. 2015
17. Argüello-Navarro AZ, Moreno-Rozo LY. Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias diazótrofes aisladas del cultivo de cacao (Theobroma cacao L.). Acta Agronómica. 2014 Jul 1;63(3):238–45.
18. Cuervo JP. Aislamiento y caracterización de Bacillos spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de Fosfato en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia. 2010.
19. Meena KR, Kanwar SS. Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. BioMed Research International. 2015.
20. Pastor-Corrales, Marcial n, Schwartz, Howard F. Problemas de Producción del Frijol en los Trópicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Apartado aéreo 6713 Cali, Colombia. Publicación CIAT No, 230.
21. Cabrera Rodríguez DD, Sánchez García Y, Guerra Sánchez D, Espinosa Reyes ÁL, Almeida Saavedra M. Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de extractos de Bryophyllum pinnata. Quím Viva. 2011;10(1).

22. Cortés-Sánchez ADJ, Mosqueda-Olivares T. Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Quím Viva*. 2013 Mar 12;12(2).
23. Demain AL. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999 Oct;52(4):455–63.
24. Mojica-Marín V, Luna-Olvera HA, Sandoval-Coronado CF, Pereyra-Alférez B, Morales-Ramos LH, González-Aguilar NA, et al. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. *Phyton B Aires*. 2009 Dec;78(2):105–10.
25. Hu Q-P, Xu J-G, Song P, Song J-N, Chen W-L. Isolation and identification of a potential biocontrol agent *Bacillus subtilis* QM3. Qinghai yak dung in China. *World J Microbiol Biotechnol*. 2008 Nov 1;24(11):2451–8.
26. Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annu Rev Plant Biol*.
27. Shoda M. Bacterial control of plant diseases. *J Biosci Bioeng*. 2000 Jan 1;89(6):515–21.
28. Földes T, Bánhegyi I, Herpai Z, Varga L, Szigeti J. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. *J Appl Microbiol*. 2000 Nov 1;89(5):840–6.
29. Reinoso Pozo Y, Casadesús Romero L, García Suárez A, Gutiérrez Pérez J, Álvarez-Rivera VP. Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad*. 2006 10(3).
30. Orberá Ratón T, Pérez Portuondo I, Ferrer Salas D, Cortés Ramos N, González Giro Z. Aislamiento de cepas del género *Bacillus* sp. con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal. *Rev Cuba Quím [Internet]*. 2005. 9;XVII(1).
31. Ortega NS, Benitez-Campo N, Cabezas-Fajardo FA. Antibacterial activity and cualitative composition propolis from two climatic regions cauca department. *Biotechnol En El Sect Agropecu Agroindustrial*. 2011 Jun;9(1):8–16.

32. Ash C, Priest FG, Collins MD. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1993 Sep 1;64(3-4):253-60.
33. García AGR, García LIV, Reyes MP. La germinación de las esporas de *Bacillus subtilis* activa la respuesta celular de daño al material genético. *Jóvenes en Cienc*. 2018 Feb 22;3(0):289-93.
34. Setlow P. Spore germination. *Curr Opin Microbiol*. 2003 Dec 1;6(6):550-6.
35. Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol*. 2006 Sep 1;101(3):514-25.
36. Setlow P. Resistance of Bacterial Spores. *Bact Stress Responses Second Ed*. 2011 Jan 1;319-32.
37. Lara CC, Oviedo L, Aleman A. Aislados nativos con potencial en la producción de ácido indol acético para mejorar la agricultura. 2011 Jul 1;9(1):17-23.
38. Peñín A. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Facultad de ciencias. Universidad de la laguna*. 2017 Jun. 91-167
39. Hernández-Rodríguez A, Heydrich-Pérez M, Diallo B, Jaziri ME, Vandeputte OM. Cell-free culture medium of *Burkholderia cepacia* improves seed germination and seedling growth in maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*) *Plant Growth Regul*. 2010 Apr 1;60(3):191-7.
40. Choudhary DK, Johri BN. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol Res*. 2009 Sep 29;164(5):493-513.
41. Hernández-Leal TI, Carrión G, Heredia G. Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*. 2011 Dec;45(8):881-92.
42. Beltrán Pineda E. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Bióloga. MSc. Microbiología. Grupo de investigación Gestión Ambiental. Universidad de Boyacá. Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu*. (2014) 15(1) 101-113.
43. Tejera-Hernández B, Heydrich-Pérez M, Rojas-Badía MM. Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agron Mesoam*. 2013 Dec;24(2):357-64.

44. Rojas Badía M, Hernández, Tejera B, Murrel, Larrea J, Mahillon. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev Bras Agroecol.* 2011 Jan 1;6:90–9.
45. Vega-Celedón P, Canchignia Martínez H, González M, Seeger M. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultiv Trop.* 2016;37:33–9.
46. Rivas-San Vicente M, Plasencia J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J Exp Bot.* 2011 Jun 1;62(10):3321–38.
47. LV Enloquecer,† G. Hughes, W. Bucker Moraes, X.-M. Xuy WW Turechek. Twenty-Five Years of the Binary Power Law for Characterizing Heterogeneity of Disease Incidence. *American Phytopathological Society.* 2017.656-680
48. Taiz L, Zeiger E. *Fisiología vegetal.* Universitat Jaume I; 2007. 646 p.
49. Amador-Alfárez KA, Díaz-González J, Loza-Cornejo S, Bivián-Castro EY. Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *Ferocactus* (Cactaceae). *Polibotánica.* 2013;(35):109–31.
50. Rodríguez En, Coruña A. Estudio de Sideróforos Procedentes de Bacterias Patógenas de peces de acuicultura. Preparación de intermedios sintéticos clave en la síntesis del sideróforo acinetobactina y análogos estructurales. 2014 :76.
51. Hernández Forte I, García N, C M, Morales Mena B. Caracterización de aislados de rizobios provenientes de nódulos de soya (*Glycine max* (L.) Merrill) con potencialidades en la promoción del crecimiento vegetal. *Cultiv Trop.* 2015 Mar;36(1):65–72.
52. D. Faraldo-Gómez J. Protein-mediated Siderophore Uptake in Gram-negative Bacteria: A Structural Perspective. In 2007. p. 105–20.
53. Hernández-Rodríguez A, Rives-Rodríguez N, Acebo-Guerrero Y, Diaz-de la Osa A, Heydrich-Pérez M, Baldani D, et al. Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Pyricularia oryzae* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev Protección Veg.* 2014 Apr;29(1):1–10.
54. Aguado-Santacruz GA, Moreno-Gómez B, Jiménez-Francisco B, García-Moya E, Preciado-Ortiz RE. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la

- asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Rev Fitotec Mex.* 2012 Mar;35(1):9–21.
55. Saha R, Saha N, Donofrio RS, Bestervelt LL. Microbial siderophores: a mini review. *J Basic Microbiol.* 2013 Apr;53(4):303–17.
 56. Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moënné-Loccoz Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil.* 2009 Aug 1;321(1–2):341–61.
 57. Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2009;63(1):541–56.
 58. Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin H-S, Patra JK. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol Res.* 2018 Jan 1;206:131–40.
 59. Singh JS. Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Resonance.* 2013 Mar 1;18(3):275–81.
 60. Mormontoy Pec, Hidalgo Elc, Pesantes Aiz. Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas aisladas de las Salinas de San Blas en Junín. *Rev Colomb Biotecnol.* 2014 Jul 1;16(2):150–7.
 61. Lau CH-F, Engelen K van, Gordon S, Renaud J, Topp E. Novel Antibiotic Resistance Determinants from Agricultural Soil Exposed to Antibiotics Widely Used in Human Medicine and Animal Farming. *Appl Environ Microbiol.* 2017 Jun 16; AEM.00989-17.
 62. Ramírez B, Alexandra I. Cuantificación de la actividad enzimática tipo quitinasa de actinomicetos y su capacidad antagónica frente a hongos fitopatógenos. *Universidad Javeriana Colombia.* 2014 May 7.105-144.
 63. Dhar Purkayastha G, Mangar P, Saha A, Saha D. Evaluation of the biocontrol efficacy of a *Serratia marcescens* strain indigenous to tea rhizosphere for the management of root rot disease in tea. *PloS One.* 2018;13(2):0191761.
 64. Sánchez T, León J, Woolcott J, Arauco K. Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros. *Rev Peru Biol.* 2004 Dec;11(2):179–86.

65. Pedersen H, Nielsen J. The influence of nitrogen sources on the alpha-amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000 Mar;53(3):278–81.
66. Tintu I, Dileep KV, Remya C, Augustine A, Sadasivan C. 6-Gingerol inhibits fungal alpha amylase: Enzyme kinetic and molecular modeling studies. *Starch - Stärke.* 2012 Aug 1;64(8):607–12.
67. Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* 2003 Jun 30;38(11):1599–616.
68. Beltrán Pineda ME, Rocha Gil ZE, Bernal Figueroa AA, Pita Morales LA. Microorganismos funcionales en suelos con y sin revegetalización en el municipio de villa de leyva, boyacá. *Colomb For.* 2017 Jun 21;20(2):159.
69. Bozzetta JLR, Carrera EEC, Huacachi PKM, Rondán SFH. Aislamiento e identificación de *Bacillus Thuringiensis* en cultivos de plátano, para la producción de bioinsecticidas. *Big Bang Faustiniiano.* 2017 Aug;6(1).
70. Sanglier JJ, Haag H, Huck TA, Fehr T. Novel bioactive compounds from *Actinomycetes*: a short review (1988–1992). *Res Microbiol.* 1993 Jan 1;144(8):633–42.
71. Guerrero MFV. Caracterización enzimática de cepas de *Fusarium* aisladas de lesiones de animales, Humanos y plantas. :152.
72. Cruz LC. Estandarización del Proceso de Producción masiva del hongo *Trichoderma koningiith003* Mediante fermentación Bifásica a escala piloto. *Microbiología Industrial.* 2007;148.
73. Sánchez T, León J, Woolcott J, Arauco K. Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros. *Rev Peru Biol.* 2004 Dec;11(2):179–86.
74. Morcelle S, T R Gomes M, Vairo Cavalli S. Caracterización bioquímica y estructural de proteasas. In 2009. p. 163–76.
75. José Eleazar Barboza Corona, Rubén Darío Pacheco Cano, Tomás Ortiz-Rodríguez, Norma M. de la Fuente Salcido, Cristóbal Castañeda Ramírez.

- Potencial de los quito-oligosacáridos generados de quitina y quitosana Potencial de los quito-oligosacáridos generados de quitina y quitosana. Acta Univ. 2012 Jan 1;21(3):14–23.
76. Arango JS, Uribe LFP, Naranjo JCP. Distribución Diferencial de Bacterias con Potencial Biocontrolador de Spongospora subterranea en Plantas de Papa (*Solanum tuberosum* cv. Diacol Capiro). Rev Fac Nac Agron Medellín. 2012 Jan 1;65(1):6337–48.
 77. González F, Mauricio J. Caracterización bioquímica y molecular de quitinasas en cepas mexicanas de *B. Thuringiensis*. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica. 2010.77-98.
 78. Parmeter JR. *Rhizoctonia Solani*, Biology and Pathology. University of California Press; 1970. 266.
 79. Anderson NA. The Genetics and Pathology of *Rhizoctonia Solani*. Annu Rev Phytopathol. 1982;20(1):329–47.
 80. Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moënné-Loccoz Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant Soil. 2009 Aug 1;321(1–2):341–61.
 81. Tsrer L. Biology, Epidemiology and Management of *Rhizoctonia solani* on Potato. J Phytopathol. 2010 Oct 1;158(10):649–58.
 82. Kamal M, Weinhold AR. Virulence of *Rhizoctonia Solani* as Influenced by Age of Inoculum in Soil. Can J Bot. 1967 Sep 1;45(9):1761–5.
 83. Gangopadhyay S, Grover RK, Haryana AU. Efficiency of fungitoxicants on the control of root rot of cowpea caused by mixed inocula of *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia bataticola* and *Fusarium solani*. Indian J Mycol Plant Pathol India. 1984.
 84. Finkler A, Koltin Y, Barash I, Sneh B, Pozniak D. Isolation of a Virus from Virulent Strains of *Rhizoctonia solani*. J Gen Virol. 1985;66(6):1221–32.
 85. Alicia Hernandez. Microbiología Industrial. Fermentacion por lote. EUNED; 2002.49-68p.
 86. Aguilar Sahagun G. Cultivo industrial de microorganismos: tipos de cultivo. Quimica industrial. Conalepfelixtovar.2012.31.

87. Zapata K, Rojano BA, Cortes FB. Efecto Térmico del Secado por Aspersión sobre los Metabolitos Antioxidantes de la Curuba Larga (*Passiflora mollissima* baley). *Inf Tecnológica*. 2015;26(1):77–84.
88. Weng Alemán Z, Esther Díaz Rosa O, Molina Á, Inalvis. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? *Rev Cuba Hig Epidemiol*. 2005 Dec;43(3):0–0.
89. Gutiérrez YAP. Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). *Rev Colomb Biotecnol*. 2009 Jul 1;11(2):8–18.
90. A JLO, Hershey C. Almacenamiento del polen de yuca (*Manihot esculenta* crantz) por medio de liofilización y varios regímenes de humedad y temperatura. *Acta Agronómica*. 1984 Jan 1;34(1):21–5.
91. Gato Cárdenas Y. Métodos de conservación y formulación de trichoderma harzianum rifai. *Fitosanidad*. 2010 Sep;14(3):189–95.
92. Ramirez JS. Liofilización de Alimentos. Universidad del Valle. *Revista ReCiTeIA*. 2006.8-23
93. Freire J.R and Sato M.L. Microbiología. Asociación latino Americana de Microbiología. Medigraphic. 1999. Vol 41 No.35-4
94. Gato Cárdenas Y. Métodos de conservación y formulación de trichoderma harzianum rifai. *Fitosanidad*. 2010 Sep;14(3):189-196.
95. Morales-Santos ME, Peña-Valdivia CB, García-Esteva A, Aguilar-Benítez G, Kohashi-Shibata J. Características físicas y de germinación en semillas y plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* l.) silvestre, domesticado y su progenie. *Agrociencia*. 2017;51(1).
96. Ulloa JA, Rosas-Ulloa P, Ramírez-Ramírez JC, Ulloa-Rangel BE, Ulloa JA, Rosas-Ulloa P, et al. Modelación matemática de las cinéticas de hidratación a diferentes temperaturas de cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) producidas en México. *CienciaUAT*. 2016 Jun;10(2):52–62.
97. Voysest O. Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): legado de variedades de América Latina 1930-1999. CIAT; 2000. 220 p.

98. Collado R, Pérez AC, Martínez IP, Rojas L, Leiva-Mora M, García LR, et al. Respuesta de cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. en condiciones inducidas de estrés térmico. *Biotechnol Veg*. 2016 Jan 19;16(1).
99. Valverde B, Danilo E. Elaboración y aplicación de dos tipos de Biol en el cultivo de brócoli (*Brassica oleracea* var. legacy). 2010 Jun 22; 35-56.
100. Arias M, Xavier R. Determinación de la efectividad de “biol Biogest Potencializado”, como fuente nutricional complementaria en el cultivo de brócoli (*Brassica oleracea*) en la Provincia de Cotopaxi. 2012 Mar 3
101. Santiago J, Mendoza M, Borrego F. Evaluación de Tomate (*Lycopersicon esculentum*, MILL). *Agron Mesoam*. :7.
102. Gresshoff PM, Doy CH. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta*. 1972 Jun;107(2):161–70.
103. Of VHE. Manual de Cultivo de Tomate. :60.
104. Meoro PH, Manzano JP. El Tomate, su cultivo y sus enfermedades. :71.
105. Borboa Flores J, Puente R, O E, Acedo Félix E, Ponce JF, Cruz M, et al. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Rev Fitotec Mex*. 2009 Dec;32(4):319–26.
106. Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Martínez-Rojero RD, Ariza-Flores R, Barrios-Ayala A, Rebolledo-Martínez A. Control biológico in vitro de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicum esculentum* Mill. *Av En Investig Agropecu*. 2008;12(3).
107. Chon S-U, Jang H-G, Kim D-K, Kim Y-M, Boo H-O, Kim Y-J. Allelopathic potential in lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. *Sci Hortic*. 2005;3(106):309–17.
108. Salusso FA, Plevich JO, Delgado ARS, Grosso LE, Ramos DF. Calidad De Plántulas De Lechuga En Diferentes Volúmenes De Celdas Y Su Influencia En El Rendimiento/Quality Lettuce Seedlings in Different Volumes of Cells and Their Influence on Yield. *Rev Eng Na Agric Vicos*. 2015;23(6):575–83.
109. Sobrero MC, Ronco A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. 2010 :14.
110. Carranza C, Lanchero O, Miranda D, Chaves B. Análisis del crecimiento de lechuga (*Lactuca sativa* L.) “Batavia” cultivada en un suelo salino de la Sabana de Bogotá. *Agron Colomb*. 2009;27(1):41–8.

111. Higuera APC, Rojas JNG, Salamanca JAM, Escobar JGR, Rendón JDV, Sánchez LB, et al. Crecimiento de *Raphanus sativus* L. con arvences *Plantago media* L. y *Polygonum nepalense* Meins. *Rev Cienc Agropecu.* 2015 Jun 19;1(1):37–61.
112. Pérez KLA, Sandoval EHP. Comportamiento fisiológico de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.) sometidas a estrés por salinidad. *Conex Agropecu JDC.* 2017 Nov 7;4(2):11–22.
113. Terry Alfonso E, Ruiz Padrón J, Tejeda Peraza T, Reynaldo Escobar I. Efectividad agrobiológica del producto bioactivo Pectimorf en el cultivo del Rábano (*Raphanus sativus* L.). *Cultiv Trop.* 2014 Jun;35(2):105–11.
114. Fazio FM. El huerto completo en poco espacio. Parkstone International; 2017. 129 p.
115. Castro Nava S. Temperatura óptima y etapa fenológica para determinar la termoestabilidad de la membrana celular en maíz y frijol. *Phyton B Aires.* 2013 Dec;82(2):249–54.
116. Doria J. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultiv Trop.* 2010 Mar;31(1):00–00.
117. Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan. *Turk J Biol.* 2005 Mar 28;29(1):29–34.
118. Elvia JC, Ortega-Rodés P, Ortega E. La inoculación de plantas con *Pantoea* sp, bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares Plant inoculation with *Pantoea* sp., phosphate solubilising-bacteria increases P concentration in leaf tissues. 2008;(1):11.
119. Nguyen C, Yan W, Tacon FL, Lapeyrie F. Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* . *Plant Soil.* 1992 Jun 1;143(2):193–9.
120. Louden BC, Haarmann D, Lynne AM. Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *J Microbiol Biol Educ JMBE.* 2011 May 19;12(1):51–3.
121. Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem.* 1987 Jan 1;160(1):47–56.

122. Louden BC, Haarmann D, Lynne AM. Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *J Microbiol Biol Educ JMBE*. 2011 May 19;12(1):51–3.
123. Cedeño G, M Á, Pazmiño Z, E D, Fernández R, D R, et al. Aislamiento y selección de bacterias autóctonas de Manabí-Ecuador con actividad celulolítica. *Cultiv Trop*. 2015 Mar;36(1):7–16.
124. Venant N, Pascal K, Ernest S. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of tomato and their in vitro antagonistic effects against phytopathogenic fungi :8.
125. Sridevi M, Mallaiah KV. Factors effecting chitinase activity of *Rhizobium*.sp. *Sesbania sesban*. *Biologia (Bratisl)*. 2008 Jun 1;63(3):307–12.
126. Castro R, Álvarez A, Machado E, Mendoza M, Gómez R, García P. Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Rev Soc Quím Perú*. 2011 Apr;77(2):101–8.
127. Walker JM. The Protein Protocols Handbook. The Bradford method for Protein Quantitation. Springer Science & Business Media; 1996. 759 p.
128. Schoonhoven A van, Corrales P, A M. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); 1987.
129. Plank JVD. Principles of Plant Infection. Elsevier; 2012. 231 p.
130. Probanza A, Lucas JA, Acero N, Mañero FJG. The influence of native rhizobacteria on european alder *Alnus glutinosa*. Growth. *Plant Soil*. 1996 May 1;182(1):59–66.
131. Ahemad M. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi—current perspective. *Arch Agron Soil Sci*.
132. Pineda B, E M. Phosphate Solubilizing Fungi in Paramo Soil Cultivated with Potato (*Solanum tuberosum*). *Cienc En Desarro*. 2014 Jul;5(2):145–54.
133. Vera DF, Pérez H, Valencia H. Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizósfera de Arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). *Acta Biológica Colomb*. 2002 Jan 1;7(1):33–40.

134. Ramírez LCC, Galvez ZYA, Burbano VEM. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. NOVA. 2014 Jul 1. 19;12(21).
135. Dehner CA, Awaya JD, Maurice PA, DuBois JL. Roles of Siderophores, Oxalate, and Ascorbate in Mobilization of Iron from Hematite by the Aerobic Bacterium *Pseudomonas mendocina*. Appl Environ Microbiol. 2010 Apr 1;76(7):2041–8.
136. Salamone IE de G, Hynes RK, Nelson LM. Role of Cytokinins in Plant Growth Promotion by Rhizosphere Bacteria. In: PGPR. Biocontrol and Biofertilization. 2005. 173–95.
137. Gopalakrishnan S, Sathya A, Vijayabharathi R, Varshney RK, Gowda CLL, Krishnamurthy L. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. 3 Biotech. 2015 Aug;5(4):355–77.
138. Badía MMR. Aislamiento y caracterización de cepas del género *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Rev Bras Agroecol. 2011 Jun 1; 6(1).
139. Zavaleta RA, Díaz LL, Vega RS. Aislamiento y selección de cultivos nativos de *Bacillus* sp. productor de amilasas a partir de residuos amiláceos del mercado La Hermelinda, Trujillo, Perú. Rev Rebiol. 2018 Feb 23;36(2):16–26.
140. Cruz Ramírez CA, Villalba Corredor LS, Mikán Venegas JF, Ospina Sánchez SA. Búsqueda y selección de una proteasa fúngica con potencial aplicación en la restauración de documentos históricos en el Archivo de Bogotá. Rev Colomb Biotecnol. 2012;XIV(1).
141. Venant N, Pascal K, Ernest S. Isolacion of *Bacillus* strains from the rhizosphere of tomato and their in vitro antagonistic effects against phytopathogenic fungi. Global Advanced Research Journal of Microbiology. 2013. Vol 2(3) pp.065-071.
142. Cabra ET, Hernández-Fernández J, Rubiano CCP. Cuantificación de proteínas totales en extractos crudos de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de Boyacá y Cundinamarca. Conex Agropecu JDC. 2018 Mar 21;3(2):37–43.

143. Fuente-Salcido D la, Margarita N, Villarreal-Prieto JM, León D, Ángel M, Pérez G, et al. Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Rev Mex Cienc Farm.* 2015 Jun;46(2):7–16.
144. Mills S, Stanton C, Hill C, Ross RP. New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2011;2:299–329.
145. Gonzalez Car. Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en tomate (*solanum lycopersicum*) variedad Santa clara. 2015:61.
146. Tejera B, Heydrich M, Rojas MM. Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev Protección Veg.* 2012 Aug;27(2):117–22.
147. Velusamy P, Gnanamanickam SS. The Effect of Bacterial Secondary Metabolites on Bacterial and Fungal Pathogens of Rice. In: *Secondary Metabolites in Soil Ecology*. Springer, Berlin, Heidelberg; 2008. 93–106.
148. Bernal A, Machado P, Cortegaza L, Carmona ER, Rivero O, Zayas CM, et al. Priming and biopriming integrated into the sugarcane micropropagation technology by Temporary Immersion Bioreactors (TIBS). *Sugar Tech.* 2008 Mar 1;10(1):42–7.
149. Vega-Celedón P, Canchignia Martínez H, González M, Seeger M. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultiv Trop.* 2016;37:33–9.
150. Quintana-Blanco WA, Pinzón-Sandoval EH, Torres DF. Evaluación del crecimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) CV Ica cerinza, bajo estrés salino evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ICA. 2016;9.
151. Otayza Ibañez. Fitopatología General. Instituto interamericano de ciencias agrícolas de la O.E.A. Orton IICA / CATIE; 64 p.
152. Becton Dickinson. BD Diagnostic Systems Instructions for use ready to use bottled media. Trademark of the American type culture collection.2003.ES-BA-257107.
153. Vandevenne CA, Ribes ME. Métodos de análisis microbiológicos de alimentos. Ediciones Díaz de Santos; 2002. 276 p.

154. Ormeño-Orrillo E, Dávila DZ. Modificación del caldo extracto de levadura manitol para la producción a mediana escala de inoculantes para leguminosas. Rev Peru Biol. 2014 Jun 9;5(2):083–9.
155. Cuadrado B, Rubio G, Santos W. Characterization of Rhizobium and Bradyrhizobium strains (with ability of nodulation) selected from bean (Vigna unguiculata) cultures as a potentials bioinoculants. Rev Colomb Cienc Quím - Farm. 2009 Jan;38(1):78–104.
156. Cuadrado B, Rubio G, Santos W. Characterization of Rhizobium and Bradyrhizobium strains (with ability of nodulation) selected from bean (Vigna unguiculata) cultures as a potentials bioinoculants. Rev Colomb Cienc Quím - Farm. 2009 Jan;38(1):78–104.
157. Ames-Gottfred NP, Christie BR, Jordan DC. Use of the Chrome Azurol S Agar Plate Technique To Differentiate Strains and Field Isolates of Rhizobium leguminosarum biovar trifolii. Appl Environ Microbiol. 1989 Mar;55(3):707–10.
158. Pérez-Miranda S, Cabirol N, George-Téllez R, Zamudio-Rivera LS, Fernández FJ. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. J Microbiol Methods. 2007 Jul 1;70(1):127–31.
159. Rubio EJ. Caracterización molecular y funcional de bacterias del género Azotobacter aisladas de suelos de la República Argentina. El rol de las auxinas en la respuesta a la inoculación de trigo. :113.
160. Cala ELS. aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador. 2005;123.
161. Lara C, Oviedo L, Alemán A. Strain native with potential in the acetic acid production indol to improve the agriculture. Biotecnol Sect Agropecu Agroindustrial. 2011 Jun;9(1):17–23.
162. Daza ANZ, Huerta ERL, Martínez FF. Determinación de pH y proteínas totales en saliva en pacientes con y sin aparatología ortodóncica fija (estudio piloto). 6.

7. ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo

No existe medio de cultivo ideal para cultivo de hongos y bacterias ya que las exigencias de las diferentes especies varían considerablemente. los medios de cultivo se clasifican de acuerdo a su composición en dos grandes grupos : *medios naturales* compuestos de infusiones de productos naturales, cuya composición exacta no se conoce y *medios sintéticos* que tienen ingredientes de composición química conocida y por lo tanto pueden duplicarse con cierto grado de precisión.(151)

a. Caldo de cultivo TSB

FUNDAMENTO:

Caldo de soya triptona (Tryptic Soy Broth) (TSB) es un medio liquido nutritivo universal nutritivo por el contenido de peptona de soja y peptona de caseína que favorece el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos exigentes, en especial las bacterias anaerobias facultativas y aerobias comunes(152),la composición del medio permite el crecimiento satisfactorio de una cantidad de microorganismo , el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico, mientras que el fosfato di potásico mantiene el pH (153) lleva por característica un color ámbar. Usado para el aumento de biomasa de bacterias.

Tabla 33. Composición para el medio TSB

REACTIVO	Para 250mL
Polisorbato 80	5 g/L
Histidina	1 g/L
Peptona de Soja	5 g/L
Sodio Tiosulfato	0,5 g/L
Lecitina	0,7 g/L

Peptona de Caseína	15 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L Agar
pH	7.0

b. Medio de cultivo TSA

FUNDAMENTO:

La aportación de caseína y peptonas de soja al Agar de Soya- triptona hace el medio muy nutritivo por el suministro de nitrógeno orgánico, particularmente aminoácidos y péptidos de cadena más larga. Tiene por base una fuente proteica (digeridos trópticos, digeridos proteicos de soja) con una pequeña cantidad de hidratos de carbono naturales, cloruro sódico. Medio por el cuales se puede realizar el conteo de colonias

Tabla 34. Composición para el medio TSA

REACTIVO	Para 1000mL
Polisorbato 80	5 g/L
Histidina	1 g/L
Peptona de Soja	5 g/L
Sodio Tiosulfato	0,5 g/L
Lecitina	0,7 g/L
Peptona de Caseína	15 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L Agar
Agar	15 g/L
pH	7.0

c. Medio de cultivo LMC (Caldo extracto de levadura- manitol)

Tabla 35. Composición para el medio LMC

REACTIVO	Para 250mL	Para 1000mL
Manitol	2.50 g	10.00 g
Extracto de levadura	0.125 g	0.50 g
K ₂ HPO ₄	0.125 g	0.50 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.025 g	0.10 g
NaCl	0.05 g	0.05 g
pH	7.0	

d. Medio de cultivo LMA (Agar extracto de levadura- manitol)

FUNDAMENTO

Manitol de levadura Agar se usa para el cultivo de organismos simbióticos que fijan el nitrógeno a saber. Especies de *Rhizobium*, este género vive libremente en el suelo y en la región de la raíz de plantas leguminosas y no leguminosas. sin embargo, solo pueden entrar en simbiosis con las plantas leguminosas infectando sus raíces y formando nódulos sobre ellas. (154) *Rhizobium* presente en estos nódulos de raíz fija el nitrógeno atmosférico, es decir, nitrógeno gaseoso del aire a compuestos de nitrógeno orgánico, que es absorbido por las plantas Por lo tanto, el papel de *Rhizobium* es notable por sus importantes contribuciones a la fertilidad del suelo.(155)

El extracto de levadura sirve como una buena fuente de aminoácidos disponibles, complejo de vitamina B y factores de crecimiento accesorio para *Rhizobium*. También se apropió del potencial de reducción de la oxidación del medio en el rango favorable para *Rhizobium* y sirve como hidrógeno donante en el proceso respiratorio (156). El manitol es la fuente de alcohol de azúcar fermentable. El calcio y el magnesio proporcionan cationes esenciales para el crecimiento de *Rhizobium*.

Tabla 36. Composición para el medio LMA

REACTIVO	Para 250 mL	Para 1000 mL
Manitol	2.50 g	10.00 g
Extracto de levadura	0.125 g	0.50 g
K_2HPO_4	0.125 g	0.50 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.025 g	0.10 g
NaCl	0.05 g	0.05 g
Agar agar	3.75 g	15.0 g
pH	7.0	

e. Medio de cultivo NBRIP (Medio de crecimiento con fosfato de Instituto Nacional de Investigación Botánica)

FUNDAMENTO

Siendo este medio es uno de los más usados por su eficiencia para seleccionar microorganismos con alta capacidad para solubilizar fuentes de P inorgánico. Es un medio selectivo que permite el crecimiento de microorganismos solubilizado res de fosfato (PO_4^{-3}).

Tabla 37. Composición para el medio NBRIP

REACTIVO	Para 250 mL	Para 1000 mL
Glucosa	2.50 g	10 g
$3Ca_3(PO_4)_2$	1.25 g	5 g
$(NH_4)_2SO_4$	0.025 g	0.10 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0625 g	0.25 g
KCl	0.05 g	0.20 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.585 g	2.34 g
Agar	3.75 g	15 g
pH	7.0	

f. Medio de cultivo CAS

FUNDAMENTO

Los sideróforos se clasifican por los ligandos utilizados para quelar el hierro férrico. Estos incluyen los catecolatos, hidroxamatos y carboxilatos. Se han desarrollado diversos ensayos para detectar diferentes fenotipos de sideróforos. Brian C. Loudon , Daniel Haarmann y Aaron M. Lynne (157) desarrollaron un ensayo de sideróforo universal usando cromo azurol S (CAS) y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) como indicadores. HDTMA tiene una calificación moderada de salud y contacto. Se debe usar el equipo de protección personal apropiado. El CAS se complementa estrechamente con hierro férrico para producir un color azul. Cuando un quelante de hierro fuerte como un sideróforo elimina el hierro del complejo de tinte, el color cambia de azul a naranja.(158)

Procedimiento de preparación

Solución I Fe-CAS: Mezclar 10 mL de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 1 mmol (preparada en HCl 10 mmol) con 50 mL de una solución acuosa de CAS (1.21 g/L). Agregar esta solución lentamente a una solución de 40 mL de CTAB (1.821 g/L) y se esteriliza en condiciones de autoclave.

Solución II Buffer: Disolver 30.24 g de PIPES en 750 mL de una solución compuesta de 0.3 g de K_2HPO_4 , 0.5 g $NaCl$ y 1g de NH_4Cl . El pH de esta solución fue ajustado a 6.8 con KOH 50% (p/v). El volumen final de la solución deberá ser de 800 mL.

Solución III Micro-elementos: disolver en 70 mL de agua, glucosa 2 g, manitol 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 493 mg, $CaCl_2$ 11 mg, $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 1.17 mg, H_3BO_3 1.4 mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.04 mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.2 mg y $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 1 mg.

Solución IV CAS aminoácidos: Preparar una solución de 30 mL de cas aminoácidos 30% (p/v). Esterilizando esta solución por filtración.

Preparación final: Agregar la solución 3 a la solución buffer, revolver y adicionar cuando este moderadamente frio el medio (sin llegar a solidificarse) la solución de Cas aminoácidos. La solución Fe-Cas debe ser adicionada en último lugar, mezclando vigorosamente el medio y verificando que el color sea azul-verdoso.

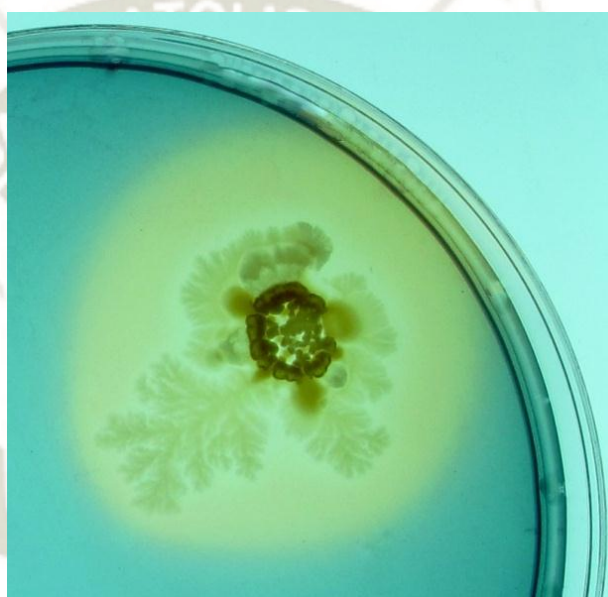


Figura 45. Ejemplo de Ensayo positivo de producción de sideróforos con el método Cas. Método tradicional propuesto por Schwyn y Neilands (1987), se puede observar la producción de sideróforos mediante un halo (amarillo) alrededor de la colonia bacteriana. Por lo general, en la naturaleza el hierro se encuentra en la forma férrica (Fe^{3+}), siendo de baja solubilidad y de difícil adquisición por la planta. Sin embargo, hay microorganismos que son capaces de reducirlo a la forma ferrosa (Fe^{2+}), siendo más soluble y metabólicamente utilizable por la planta. (159)

g. Agar quitina coloidal

FUNDAMENTO:

El medio de cultivo permite un buen criterio de selectividad dada su limitación en la fuente de carbono, en este caso la quitina coloidal particulada como única fuente de carbono, la actividad de la quitinasa se ve regulada por la disponibilidad del sustrato y el medio razón por la cual se denotaría la actividad enzimática, debido a las condiciones del medio como el pH y las concentraciones de NaCl. (160)

Tabla 38. Composición para el medio Agar quitina coloidal

REACTIVO	Para 500 mL
Quitina	5 g
Extracto de levadura	0.5 g
K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
NaCl	0.1 g
Agar	15 g
pH	7

h. Medio PDA (Agar Papa Dextrosa)

FUNDAMENTO

El Agar Papa Dextrosa (Potato Dextrose Agar, PDA, por sus siglas en inglés) La infusión de patata promueve un crecimiento abundante de los hongos y levaduras y el agar es adicionado como agente solidificante, la mayoría de los hongos crecen en medios de cultivos en alto contenido de carbohidratos, es un medio de propósito general para levaduras y hongos que puede ser suplementado con ácidos o antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano añadiendo HCl al 1%. En este medio de cultivo ciertos hongos que frecuentemente son contaminantes de laboratorios crecen rápidamente y enmascaran el desarrollo de otros hongos más lentos. una de las utilidades favorables de este medio PDA es para la recuperación o aislamiento de hongos provenientes de plantas. (151)

Tabla 39. Composición para el medio PDA

REACTIVO	Para 500 mL
Extracto de papa	2.0 g
Dextrosa	10.0 g
Agar- agar	7.5 g
pH	7.0

i. Agar Agua

FUNDAMENTO:

Este medio sencillo consiste en preparar 7.5 g por litro de agua destilada es recomendado para procesos como la germinación debido a la humedad que proporcionara, también puede ser utilizado para la germinación de conidios de hongos como fusarium que serán utilizados para iniciar un cultivo. (151)

Tabla 40. Composición para el medio agar agua

Reactivo	Para 250 mL	Para 1000 mL
Agar-agar	1.875 g	7.5 g

Anexo 2. Reactivos

a. Reactivo Salkowsky

El reactivo de Salkowsky preparado a partir de cloruro férrico en ácido sulfúrico, empleado en el método colorimétrico permite la oxidación de compuestos indólicos por sales férricas ; cuando la respuesta es positiva se obtiene una coloración rosada que va desde el rosa claro a intenso dependiendo la concentración del ácido indol acético presente, como lo mencionan Cecilia Lara et al.(161)

Tabla 41. Composición para el reactivo Salkowsky

REACTIVO	PARA 500 mL
$FeCl_3$ (0.01M)	0.8 g
H_2SO_4 (7.1M)	190 mL
Agua destilada	300 mL

b. Reactivo Bradford

Está basado en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Por lo tanto, este método se basa en la propiedad del Azul Brillante de Coomasie G-250 de presentarse en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando el colorante se une a la proteína.(162)

Tabla 42. Composición para el reactivo Bradford

REACTIVO	VOLUMEN
Azul de coomasie G-250	5 mL
Etanol	2.5 mL
Ac.fosforico	5 mL
agua	Hasta 50 mL

c. Alcohol de 70°

Desinfección, es un efectivo antibacterial

Se realiza haciendo una dilución del alcohol de 96°, a través de la siguiente fórmula:

$$96^\circ \times V_o = 70^\circ V_f$$

V_o = el volumen que debo agregar de alcohol de 96°

V_f = el volumen que deseo obtener de alcohol de 70°

d. Lejía al 3%

Hipoclorito de sodio es utilizado para limpieza y desinfección en el laboratorio

La lejía debe ser diluida ya que se encuentra concentrada al 7.5%

$$3\% (V_f) = 7.5\% (V_o)$$





















































































V_f = el volumen que deseo obtener de lejía al 3%

V_o = el volumen que debo agregar de lejía al 7.5%g

Anexo 3: Definición de ligando

En un compuesto inorgánico de coordinación, cada átomo o grupo de átomos que está unido al átomo central. Molécula, grupo, ión o átomo que está unido de forma covalente o no covalente a una entidad molecular (que puede ser poliatómica), considerada de forma arbitraria 'central' con respecto al ligando. Por ejemplo, un protón (H^+) puede ser ligando de una proteína

Anexo 4: Esquema de distribución de macetas de frijol a nivel invernadero

Tratamiento	Método de conservación	R1	R2	R3	R4+P	R5+P	R6+P	R7+P
Fermentado	Temperatura ambiente							
	4°C							
	-20°C							
	Liofilizado							
Sobrenadante	Temperatura ambiente							
	4°C							
	-20°C							
	Liofilizado							
Rhizobium E-10								
Testigo (Agua)								
Control Químico								
Patógeno								

*P= patógeno (*Rhizoctonia solani*)

La distribución de tratamientos en el ensayo se da separando dos grupos de tratamiento el fermentado y el sobrenadante del ambos con los cuatro tratamientos de conservación que son a temperatura ambiente, a 4 °C , a -20 °C y liofilizado, cada uno de estos posee 7 repeticiones en maceta con dos semillas cada una, el lote de cada repetición se divide en dos objetivos el primero para el análisis de promoción de crecimiento el cual consta de 3 macetas con un total de 6 semillas, este parámetro a evaluar requiere de su control

positivo que es un lote con inoculación de *Rhizobium* E-10 y un testigo con un lote de macetas con solo inóculo de agua. El segundo objetivo para el análisis de biocontrol contra el hongo patógeno *Rhizoctonia solani* de cada lote de tratamiento a diferente temperatura de conservación se utiliza las cuatro macetas restantes con un total de 8 semillas, de igual forma este parámetro a evaluar requiere de su control positivo que es HOMAI un fungicida químico y un testigo que es solo un lote con una única inoculación del patógeno. Teniendo un total de 84 macetas con un número final de 168 semillas plantadas. En la tabla se señala el grupo de macetas con patógeno con la letra +P.



Anexo 5: Tabla de medidas de la evaluación de cada repetición del tratamiento de germinación *in vitro* de semillas de frijol.

TRATAMIENTO	24 h	32 h	48 h	56 h	72 h	80 h	96 h
Fermentado	0	0	0	5	14	14	20
Fermentado	0	0	10	14	18	18	36
Fermentado	0	0	0	4	9	10	21
Fermentado	0	0	11	16	1	3	10
Fermentado	0	0	0	5	11	11	19
Fermentado	0	0	3	7	15	15	19
Fermentado	0	0	0	4	7	7	10
Fermentado	0	0	9	13	18	19	25
Fermentado	0	0	4	10	18	19	25
Fermentado	0	0	10	14	20	20	27
Fermentado	0	0	5	12	19	19	22
Fermentado	0	0	11	16	21	21	24
Fermentado	0	0	0	5	16	16	19
Fermentado	0	0	0	4	12	12	13
Fermentado	0	0	0	4	14	14	15
Fermentado	0	0	0	5	13	13	13
Fermentado	0	0	0	4	13	14	14
Fermentado	0	0	12	15	15	15	16
Fermentado	0	0	11	15	20	20	22
Fermentado	0	0	0	6	17	18	18
Fermentado	0	0	0	4	10	12	13
Fermentado	0	0	5	12	17	17	19
Fermentado	0	0	0	0	4	4	5
Fermentado	0	0	11	16	23	23	24
Fermentado	0	0	0	6	16	17	19
Fermentado	0	0	0	5	15	15	15
Fermentado	0	0	12	18	24	24	24
Fermentado	0	0	0	4	8	8	8
Fermentado	0	0	10	14	8	9	11
Fermentado	0	0	9	16	21	22	23
Biomasa	0	0	10	11	15	15	16
Biomasa	0	0	0	0	16	16	17
Biomasa	0	0	5	5	14	15	18
Biomasa	0	0	6	6	18	18	18
Biomasa	0	0	0	0	14	14	14
Biomasa	0	0	0	0	15	15	17

Biomasa	0	0	0	0	20	21	21
Biomasa	0	0	8	9	15	16	16
Biomasa	0	0	0	0	11	11	11
Biomasa	0	0	0	0	3	4	6
Biomasa	0	0	0	0	12	13	14
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	3	10	10	16	16	16
Biomasa	0	7	13	13	21	21	23
Biomasa	0	0	0	0	20	20	20
Biomasa	0	7	10	11	19	19	19
Biomasa	0	0	0	0	14	14	14
Biomasa	0	0	3	4	18	18	19
Biomasa	0	0	3	3	17	17	17
Biomasa	0	0	0	0	6	6	7
Biomasa	0	0	0	0	13	14	14
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	7	7	17	17	17
Biomasa	0	0	0	0	12	12	12
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	0	0	6	7	7
Biomasa	0	0	5	6	11	11	11
Biomasa	0	0	0	0	9	10	10
Biomasa	0	0	7	8	18	18	18
Biomasa	0	5	8	8	15	15	17
Metabolito	0	0	6	7	12	12	18
Metabolito	0	0	7	7	15	15	22
Metabolito	0	7	10	10	17	18	23
Metabolito	0	5	10	11	20	20	26
Metabolito	0	10	13	14	23	23	26
Metabolito	0	8	12	12	23	23	25
Metabolito	0	8	12	12	22	23	23
Metabolito	0	3	11	11	21	21	24
Metabolito	0	9	14	14	22	23	27
Metabolito	0	0	12	12	22	23	26
Metabolito	0	10	13	13	20	20	25
Metabolito	0	11	13	14	22	22	25
Metabolito	0	8	12	12	22	23	24
Metabolito	0	11	15	16	23	23	23
Metabolito	0	9	12	12	20	20	24
Metabolito	0	3	5	5	19	19	23
Metabolito	0	12	10	10	25	25	28
Metabolito	0	5	10	10	23	24	27

Metabolito	0	3	7	7	23	24	27
Metabolito	0	2	7	7	22	23	25
Metabolito	0	0	0	0	16	16	16
Metabolito	0	8	15	16	25	26	26
Metabolito	0	0	0	0	13	14	14
Metabolito	0	3	8	8	20	21	21
Metabolito	0	5	10	10	18	18	18
Metabolito	0	8	13	13	23	23	23
Metabolito	0	12	13	14	26	26	26
Metabolito	0	5	13	13	25	26	26
Metabolito	0	7	13	13	27	27	30
Metabolito	0	9	12	12	23	24	27
E-10	0	0	0	0	11	12	13
E-10	0	0	7	8	20	20	21
E-10	0	0	0	0	8	8	9
E-10	0	0	13	14	12	13	15
E-10	0	9	0	0	21	21	22
E-10	0	0	0	0	9	9	10
E-10	0	0	0	0	12	12	12
E-10	0	0	0	0	10	11	11
E-10	0	0	0	0	12	12	14
E-10	0	0	0	0	12	13	16
E-10	0	0	0	0	12	12	13
E-10	0	0	0	1	5	6	8
E-10	0	0	0	0	13	13	16
E-10	0	0	0	1	0	0	0
E-10	0	0	0	1	14	14	16
E-10	0	0	0	0	15	15	17
E-10	0	0	0	0	12	13	15
E-10	0	0	0	0	8	8	9
E-10	0	0	0	0	15	15	17
E-10	0	0	0	1	16	17	19
E-10	0	0	0	0	10	11	13
E-10	0	10	15	15	19	19	20
E-10	0	0	0	0	17	17	17
E-10	0	3	10	10	21	22	22
E-10	0	0	9	10	21	21	22
E-10	0	0	0	0	10	10	11
E-10	0	0	0	0	12	12	12
E-10	0	0	0	0	10	11	11
E-10	0	0	0	0	10	10	12
E-10	0	0	0	0	0	0	0

Control	0	3	13	21	25	25	25
Control	0	0	14	20	25	26	26
Control	0	0	15	20	26	26	26
Control	0	0	15	21	26	26	27
Control	0	0	14	20	25	25	25
Control	0	0	5	12	22	23	23
Control	0	0	0	8	19	19	19
Control	0	0	10	17	22	23	23
Control	0	0	6	15	22	22	22
Control	0	0	6	15	23	23	23
Control	0	5	15	28	30	30	30
Control	0	0	10	25	28	28	28
Control	0	0	11	20	22	22	22
Control	0	0	11	20	24	24	24
Control	0	0	14	22	26	26	26
Control	0	0	15	22	27	27	27
Control	0	0	15	19	25	25	25
Control	0	0	16	20	25	25	25
Control	0	0	12	19	26	26	26
Control	0	0	13	19	25	25	26
Control	0	0	14	20	25	25	25
Control	0	0	15	19	25	25	25
Control	0	0	14	21	25	25	26
Control	0	3	17	22	28	28	28
Control	0	0	14	20	24	24	24
Control	0	5	15	27	30	30	30
Control	0	0	13	18	25	25	25
Control	0	0	14	21	27	27	27
Control	0	0	12	21	28	28	28
Control	0	0	11	17	25	25	25

Anexo 6: Tabla de medidas de la evaluación de cada repetición de tratamiento de germinación *in vitro* de semillas de brócoli.

TRATAMIENTO	24 h	32 h	48 h	56 h	72 h	80 h	96 h
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	0	4	5	10	12	13
Fermentado	0	0	0	0	9	10	12
Fermentado	0	0	5	7	11	13	16
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	0	2	6	0	0	0
Fermentado	0	0	5	6	10	11	16
Fermentado	0	0	3	5	8	11	15
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	0	3	6	15	17	20
Fermentado	0	0	2	6	14	17	19
Fermentado	0	0	3	5	15	16	20
Fermentado	0	0	2	4	9	10	16
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	0	3	6	13	15	19
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	0	4	8	17	19	23
Fermentado	0	0	2	7	13	15	21
Fermentado	0	0	2	4	7	10	17
Fermentado	0	0	4	7	13	16	19
Fermentado	0	0	0	4	7	9	14
Fermentado	0	0	5	7	8	11	15
Fermentado	0	0	3	4	8	10	13
Fermentado	0	0	4	7	10	13	17
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	0	4	8	14	16	20
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	0	2	0	0	0
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	5	8	12	15	17

Biomasa	0	0	3	3	8	10	13
Biomasa	0	0	5	6	15	18	21
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	2	5	8	10	12
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	7	10	16	19	22
Biomasa	0	0	5	7	13	16	18
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	5	6	15	18	19
Biomasa	0	0	0	0	11	14	16
Biomasa	0	0	3	7	10	13	15
Biomasa	0	1	6	9	16	20	22
Biomasa	0	0	5	7	10	12	15
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	0	10	0	0	0
Biomasa	0	2	7	10	15	18	21
Biomasa	0	0	2	5	10	11	13
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	1	5	9	14	15	17
Metabolito	0	1	6	8	18	21	25
Metabolito	0	0	0	0	0	0	0
Metabolito	0	1	4	6	14	18	22
Metabolito	0	0	0	1	5	11	15
Metabolito	0	0	3	8	1	7	12
Metabolito	0	1	6	9	15	19	23
Metabolito	0	1	0	1	0	0	0
Metabolito	0	0	7	8	16	20	26
Metabolito	0	0	3	5	11	14	20
Metabolito	0	0	4	8	14	16	20
Metabolito	0	0	0	0	0	0	0
Metabolito	0	1	5	4	13	16	19
Metabolito	0	1	6	10	18	21	26
Metabolito	0	0	4	7	14	17	21
Metabolito	0	0	6	10	15	17	22
Metabolito	0	0	8	11	17	20	25
Metabolito	0	0	7	10	18	22	27
Metabolito	0	0	0	0	0	0	0
Metabolito	0	0	6	7	13	16	21
Metabolito	0	0	4	7	15	18	21

Metabolito	0	1	5	8	12	15	19
Metabolito	0	0	0	0	0	0	0
Metabolito	0	0	0	0	0	0	0
Metabolito	0	0	5	8	13	15	20
Metabolito	0	1	5	10	15	20	26
Metabolito	0	1	6	12	17	21	28
Metabolito	0	0	4	11	18	21	26
Metabolito	0	0	0	0	0	0	0
Metabolito	0	0	2	0	10	14	19
Metabolito	0	0	3	7	10	15	21
E-10	0	0	0	10	14	15	17
E-10	0	0	3	8	13	16	19
E-10	0	0	2	3	10	12	14
E-10	0	0	0	0	0	0	0
E-10	0	0	0	0	0	0	0
E-10	0	0	1	4	10	12	15
E-10	0	0	0	0	0	0	0
E-10	0	0	0	0	0	0	0
E-10	0	0	0	0	0	0	0
E-10	0	0	6	8	9	13	16
E-10	0	0	5	8	12	13	17
E-10	0	0	3	3	9	10	14
E-10	0	0	1	4	7	7	7
E-10	0	0	0	0	0	0	0
E-10	0	0	5	8	12	12	13
E-10	0	0	3	7	12	13	13
E-10	0	0	0	0	0	0	0
E-10	0	0	3	2	10	11	12
E-10	0	0	4	5	15	15	17
E-10	0	0	5	3	15	15	16
E-10	0	0	5	7	15	15	19
E-10	0	1	8	11	17	18	22
E-10	0	0	3	10	10	11	15
E-10	0	0	6	8	15	15	20
E-10	0	0	0	0	0	0	0
E-10	0	0	9	9	16	16	18
E-10	0	0	0	0	0	0	0
E-10	0	0	0	0	0	0	0
E-10	0	0	0	0	2	3	9
E-10	0	0	4	6	17	17	21
Control -	0	0	0	0	9	10	14
Control -	0	0	1	5	10	10	15

Control -	0	0	0	1	0	11	15
Control -	0	0	0	2	8	8	11
Control -	0	0	2	3	10	11	13
Control -	0	1	0	0	0	0	0
Control -	0	1	0	0	7	7	10
Control -	0	0	3	5	10	10	13
Control -	0	0	0	4	8	9	11
Control -	0	0	0	0	0	0	0
Control -	0	0	4	5	10	10	14
Control -	0	0	0	0	0	0	0
Control -	0	1	0	0	2	4	10
Control -	0	0	0	3	7	8	10
Control -	0	0	8	3	11	11	12
Control -	0	0	0	4	8	9	13
Control -	0	0	0	0	0	0	0
Control -	0	0	0	0	0	0	0
Control -	0	0	0	0	9	9	11
Control -	0	0	0	0	9	10	12
Control -	0	0	0	0	0	0	0
Control -	0	0	2	3	7	8	12
Control -	0	0	0	0	0	0	0
Control -	0	0	0	0	0	0	0
Control -	0	0	0	0	0	0	0
Control -	0	0	0	0	5	6	11
Control -	0	0	0	0	0	0	0
Control -	0	0	0	0	0	0	0
Control -	0	0	2	2	5	7	10
Control -	0	0	0	0	0	0	0

Anexo 7: Tabla de medidas de la evaluación de cada repetición de tratamiento de germinación *in vitro* de semillas de rabanito.

TRATAMIENTO	24 h	32 h	48 h	56 h	72 h	80 h	96 h
Fermentado	0	1	8	14	17	18	19
Fermentado	0	0	7	10	10	11	12
Fermentado	0	0	8	13	12	12	14
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	1	1	2	5	6	8
Fermentado	0	0	1	2	4	5	7
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	1	3	6	10	11	13
Fermentado	0	0	2	7	12	12	13
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	0	4	5	9	10	11
Fermentado	0	0	2	4	8	8	10
Fermentado	0	0	2	4	9	9	12
Fermentado	0	0	3	6	15	16	18
Fermentado	0	0	8	13	18	18	19
Fermentado	0	0	5	5	9	10	12
Fermentado	0	0	5	7	10	10	13
Fermentado	0	0	2	4	6	6	8
Fermentado	0	0	3	4	7	8	10
Fermentado	0	0	3	5	11	11	14
Fermentado	0	0	2	4	9	10	13
Fermentado	0	0	3	5	10	11	14
Fermentado	0	1	7	10	16	16	18
Fermentado	0	0	1	2	2	3	6
Fermentado	0	0	6	9	12	13	15
Fermentado	0	1	4	8	13	13	15
Fermentado	0	1	5	10	15	15	18
Fermentado	0	0	3	7	10	11	14
Fermentado	0	1	2	3	8	9	13
Fermentado	0	0	4	4	7	7	10
Biomasa	0	0	4	5	14	18	19
Biomasa	0	0	10	13	19	23	23
Biomasa	0	1	10	13	19	21	22
Biomasa	0	0	12	15	18	18	19
Biomasa	0	0	3	4	9	10	12
Biomasa	0	1	12	20	21	22	23
Biomasa	0	1	8	13	19	19	20
Biomasa	0	0	7	10	16	16	16

Biomasa	0	1	10	17	6	7	9
Biomasa	0	0	8	10	20	20	21
Biomasa	0	0	5	18	0	0	0
Biomasa	0	1	13	10	12	13	15
Biomasa	0	0	6	15	19	20	21
Biomasa	0	0	10	18	24	24	25
Biomasa	0	0	0	0	3	3	6
Biomasa	0	0	8	13	20	21	23
Biomasa	0	0	0	0	15	15	17
Biomasa	0	0	8	15	20	20	22
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	8	14	16	17	19
Biomasa	0	0	8	12	17	18	18
Biomasa	0	1	10	13	18	20	20
Biomasa	0	0	7	10	15	15	15
Biomasa	0	0	9	15	22	22	22
Biomasa	0	0	7	15	17	18	18
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	5	11	13	13	13
Biomasa	0	0	3	8	14	14	14
Biomasa	0	0	6	10	16	16	16
Biomasa	0	0	6	13	18	19	19
Metabolito	0	0	0	0	0	0	0
Metabolito	0	0	15	18	23	23	25
Metabolito	0	1	13	15	27	27	29
Metabolito	0	1	12	14	18	19	22
Metabolito	0	1	0	0	0	0	0
Metabolito	0	0	18	17	22	23	25
Metabolito	0	0	12	12	25	25	27
Metabolito	0	1	10	15	23	23	26
Metabolito	0	0	18	20	29	30	33
Metabolito	0	0	0	0	0	0	0
Metabolito	0	0	5	10	22	23	25
Metabolito	0	0	15	20	30	30	34
Metabolito	0	0	15	20	31	32	33
Metabolito	0	0	16	13	26	27	29
Metabolito	0	0	22	18	29	30	34
Metabolito	0	0	10	13	27	28	30
Metabolito	0	0	18	18	26	27	31
Metabolito	0	0	6	8	16	17	31
Metabolito	0	0	10	12	22	22	26
Metabolito	0	0	19	15	25	26	28

Metabolito	0	0	4	0	13	14	17
Metabolito	0	0	12	15	28	29	32
Metabolito	0	0	15	19	22	22	27
Metabolito	0	0	12	14	14	15	18
Metabolito	0	0	8	12	27	27	29
Metabolito	0	0	0	0	0	0	0
Metabolito	0	0	5	8	14	14	18
Metabolito	0	0	12	15	17	18	23
Metabolito	0	0	10	14	23	23	26
Metabolito	0	0	10	15	25	25	27
E-10	0	0	1	7	13	13	16
E-10	0	1	4	6	6	7	10
E-10	0	0	0	0	0	0	0
E-10	0	0	5	10	16	17	21
E-10	0	0	0	0	0	0	0
E-10	0	0	0	0	0	0	0
E-10	0	2	12	20	30	30	34
E-10	0	0	12	16	17	19	24
E-10	0	0	0	0	0	0	0
E-10	0	2	14	18	28	29	35
E-10	0	0	5	9	17	17	21
E-10	0	0	7	8	23	24	28
E-10	0	0	8	8	26	26	28
E-10	0	0	8	8	25	25	29
E-10	0	3	10	11	21	22	26
E-10	0	0	9	10	23	23	27
E-10	0	2	13	13	20	20	25
E-10	1	3	12	13	31	31	35
E-10	0	3	14	14	24	25	30
E-10	0	2	15	16	25	25	31
E-10	0	0	15	16	19	19	24
E-10	0	1	0	8	8	9	13
E-10	0	0	7	8	17	17	22
E-10	0	0	8	11	25	25	27
E-10	0	0	10	11	31	31	33
E-10	0	0	9	12	21	21	24
E-10	0	0	0	5	15	16	20
E-10	0	0	0	0	0	0	0
E-10	0	0	9	13	24	24	26
E-10	0	0	9	12	18	19	23
Control -	0	0	1	2	9	9	14
Control -	0	1	1	2	7	7	10

Control -	0	1	1	1	7	8	12
Control -	0	0	2	3	9	9	14
Control -	0	0	2	2	10	11	15
Control -	0	1	0	0	8	9	16
Control -	0	1	1	2	10	10	16
Control -	0	0	2	2	9	10	15
Control -	0	0	0	0	0	0	0
Control -	0	0	0	0	0	0	0
Control -	0	0	0	0	0	0	0
Control -	0	0	1	1	5	6	11
Control -	0	1	0	0	9	9	13
Control -	0	0	1	2	9	9	14
Control -	0	1	1	1	9	9	14
Control -	0	0	2	2	10	10	15
Control -	0	0	3	3	11	11	15
Control -	0	1	0	0	10	10	14
Control -	0	0	0	0	9	10	13
Control -	0	0	1	2	7	8	12
Control -	0	0	3	3	7	7	11
Control -	0	0	0	0	0	0	0
Control -	0	1	0	0	7	8	13
Control -	0	0	0	0	8	8	14
Control -	0	0	1	2	10	10	15
Control -	0	0	0	0	9	9	14
Control -	0	0	1	1	10	10	13
Control -	0	1	1	1	11	11	15
Control -	0	1	2	2	11	12	16
Control -	0	1	1	2	10	10	14

Anexo 8: Tabla de medidas de la evaluación de cada repetición de tratamiento de germinación *in vitro* de semillas de lechuga.

TRATAMIENTO	24 h	32 h	48 h	56 h	72 h	80 h
Fermentado	0	1	8	12	4	6
Fermentado	0	0	0	0	5	7
Fermentado	0	0	6	10	17	19
Fermentado	0	1	9	11	14	15
Fermentado	0	0	4	5	10	10
Fermentado	0	0	8	11	15	16
Fermentado	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	1	11	12	16	16
Fermentado	0	0	0	2	9	10
Fermentado	0	2	10	12	17	17
Fermentado	0	0	5	7	13	13
Fermentado	0	0	7	10	14	14
Fermentado	0	2	8	11	12	13
Fermentado	0	0	0	4	5	5
Fermentado	0	0	2	4	18	18
Fermentado	0	0	0	2	4	4
Fermentado	0	0	5	8	9	9
Fermentado	0	0	7	12	16	17
Fermentado	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	2	11	13	19	19
Fermentado	0	1	6	7	12	13
Fermentado	0	1	7	12	15	15
Fermentado	0	2	7	11	14	14
Fermentado	0	0	5	5	10	10
Fermentado	0	2	6	7	13	14
Fermentado	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	2	8	11	16	16
Fermentado	0	0	5	8	15	15
Fermentado	0	2	7	13	16	16
Fermentado	0	1	7	10	14	15
Biomasa	0	0	5	10	12	12
Biomasa	0	0	4	8	14	14
Biomasa	0	0	7	10	4	5
Biomasa	0	2	9	9	13	13
Biomasa	0	0	5	6	10	10
Biomasa	0	0	2	3	5	5
Biomasa	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	0	0	0	0

Biomasa	0	0	7	8	15	15
Biomasa	0	0	6	7	11	12
Biomasa	0	0	5	7	12	12
Biomasa	0	0	4	8	15	15
Biomasa	0	0	0	0	8	9
Biomasa	0	2	10	12	20	21
Biomasa	0	0	9	10	17	17
Biomasa	0	2	8	12	15	15
Biomasa	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	0	0	5	5
Biomasa	0	0	7	11	18	18
Biomasa	0	0	7	8	10	11
Biomasa	0	0	3	5	13	13
Biomasa	0	0	5	5	12	12
Biomasa	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	5	8	12	13
Biomasa	0	0	7	8	16	17
Biomasa	0	0	6	7	16	16
Biomasa	0	1	7	7	13	14
Biomasa	0	0	5	6	12	12
Metabolito	0	0	2	4	10	12
Metabolito	0	0	5	5	14	15
Metabolito	0	0	5	5	13	13
Metabolito	0	0	4	5	12	13
Metabolito	0	1	6	7	10	11
Metabolito	0	0	6	7	14	16
Metabolito	0	1	6	7	14	14
Metabolito	0	1	7	8	15	16
Metabolito	0	0	5	6	15	16
Metabolito	0	1	6	6	13	14
Metabolito	0	1	7	8	13	13
Metabolito	0	0	3	5	10	11
Metabolito	0	1	5	7	13	13
Metabolito	0	0	0	0	3	5
Metabolito	0	0	2	3	5	6
Metabolito	0	0	0	0	0	0
Metabolito	0	0	4	6	15	15
Metabolito	0	0	7	8	14	14
Metabolito	0	1	5	7	13	14
Metabolito	0	1	6	6	12	13

Metabolito	0	0	5	7	14	16
Metabolito	0	0	0	0	0	0
Metabolito	0	0	4	6	12	13
Metabolito	0	0	5	8	12	12
Metabolito	0	0	0	0	0	0
Metabolito	0	0	0	4	6	9
Metabolito	0	1	2	9	15	17
Metabolito	0	1	7	8	13	13
Metabolito	0	0	2	5	8	8
Metabolito	0	1	5	7	12	15
E-10	0	1	7	13	17	17
E-10	0	0	8	15	20	20
E-10	0	0	8	12	20	20
E-10	0	0	2	4	9	9
E-10	0	0	5	6	13	14
E-10	0	0	2	15	20	20
E-10	0	0	11	13	16	16
E-10	0	0	12	15	21	22
E-10	0	2	13	17	30	30
E-10	0	0	9	12	26	27
E-10	0	0	3	4	9	9
E-10	0	0	0	0	4	5
E-10	0	0	0	0	0	0
E-10	0	0	6	7	16	17
E-10	0	0	9	12	16	16
E-10	0	0	10	13	18	18
E-10	0	0	3	5	11	12
E-10	1	1	9	12	19	19
E-10	0	0	9	11	18	19
E-10	0	0	7	10	18	18
E-10	0	0	3	10	16	16
E-10	0	0	10	15	18	20
E-10	0	0	1	12	17	17
E-10	0	0	8	11	16	16
E-10	0	0	6	11	20	20
E-10	0	0	6	11	20	20
E-10	0	0	8	11	15	16
E-10	0	1	11	13	18	18
E-10	0	1	12	12	19	19
E-10	0	0	0	0	0	0
Control -	0	0	3	6	10	11
Control -	0	0	5	8	13	13

Control -	0	0	0	0	10	10
Control -	0	0	3	6	10	11
Control -	0	0	12	12	18	18
Control -	0	0	0	0	0	0
Control -	0	0	7	12	6	7
Control -	0	0	8	13	14	14
Control -	0	0	3	7	12	12
Control -	0	0	5	7	12	12
Control -	0	0	7	12	12	12
Control -	0	0	6	12	15	15
Control -	0	0	0	0	0	0
Control -	0	0	0	0	7	8
Control -	0	2	5	10	17	17
Control -	0	0	6	9	12	12
Control -	0	0	9	14	26	26
Control -	0	0	6	10	15	16
Control -	0	0	5	12	15	15
Control -	0	2	10	13	16	16
Control -	0	2	3	14	16	16
Control -	0	0	4	12	15	15
Control -	0	0	2	4	4	4
Control -	0	0	3	11	13	13
Control -	0	0	6	1	3	3
Control -	0	1	6	7	14	14
Control -	0	0	5	6	11	11
Control -	0	0	7	6	11	12
Control -	0	0	5	9	13	13
Control -	0	0	7	7	11	12

Anexo 9: Tabla de medidas de la evaluación de cada repetición de tratamiento de germinación *in vitro* de semillas de tomate.

TRATAMIENTO	24 h	32 h	48 h	56 h	72 h	80 h	96 h
Fermentado	0	0	1	4	6	12	19
Fermentado	0	0	0	2	4	11	15
Fermentado	0	0	2	5	11	28	31
Fermentado	0	0	2	5	10	22	25
Fermentado	0	0	0	2	5	10	15
Fermentado	0	0	0	2	5	15	22
Fermentado	0	0	2	6	12	17	21
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	0	2	3	9	22	25
Fermentado	0	0	2	4	10	22	24
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	0	4	6	15	29	31
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	0	3	5	10	25	31
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	0	2	4	9	10	16
Fermentado	0	0	2	6	11	10	17
Fermentado	0	0	2	5	10	28	32
Fermentado	0	0	0	3	7	23	27
Fermentado	0	0	0	1	2	2	6
Fermentado	0	0	2	4	8	24	28
Fermentado	0	0	0	2	3	11	15
Fermentado	0	0	2	5	10	23	30
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	0	0	3	5	16	24
Fermentado	0	0	0	1	4	9	15
Fermentado	0	0	0	0	0	0	0
Fermentado	0	0	0	2	5	9	16
Fermentado	0	0	0	3	7	10	15
Biomasa	0	0	3	10	16	24	33
Biomasa	0	0	0	3	4	10	15
Biomasa	0	0	2	5	13	10	14
Biomasa	0	0	0	3	7	21	26
Biomasa	0	0	2	3	8	25	27
Biomasa	0	0	2	3	8	24	26
Biomasa	0	0	0	0	0	0	2
Biomasa	0	0	2	5	12	26	30

Biomasa	0	0	3	6	13	26	30
Biomasa	0	0	3	7	15	14	19
Biomasa	0	0	1	1	3	12	18
Biomasa	0	0	0	4	8	16	26
Biomasa	0	0	0	5	10	11	17
Biomasa	0	0	2	5	9	18	25
Biomasa	0	0	1	3	8	20	26
Biomasa	0	0	3	6	14	23	29
Biomasa	0	0	3	4	12	21	29
Biomasa	0	0	3	0	0	0	0
Biomasa	0	0	4	7	16	24	30
Biomasa	0	0	0	4	9	18	26
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	0	3	4	15	21
Biomasa	0	0	3	6	14	23	26
Biomasa	0	0	0	0	0	0	0
Biomasa	0	0	0	5	8	17	25
Biomasa	0	0	0	2	4	13	19
Biomasa	0	0	0	4	10	26	31
Biomasa	0	0	2	5	11	28	32
Biomasa	0	0	2	6	10	25	33
Biomasa	0	0	2	6	13	28	29
Metabolito	0	0	1	7	16	24	33
Metabolito	0	0	1	4	6	13	22
Metabolito	0	0	0	0	0	0	1
Metabolito	0	0	0	3	5	11	16
Metabolito	0	0	0	0	0	0	0
Metabolito	0	0	0	4	8	14	22
Metabolito	0	0	0	0	0	0	1
Metabolito	0	0	2	7	12	28	35
Metabolito	0	0	0	0	3	10	14
Metabolito	0	0	2	4	9	13	22
Metabolito	0	0	2	6	11	12	23
Metabolito	0	0	3	10	15	21	29
Metabolito	0	0	2	3	6	11	15
Metabolito	0	0	0	3	6	9	16
Metabolito	0	0	0	6	8	20	25
Metabolito	0	0	2	7	12	22	28
Metabolito	0	0	1	6	12	20	27
Metabolito	0	0	3	5	13	23	30
Metabolito	0	0	2	5	10	23	28
Metabolito	0	0	3	5	10	21	27

Metabolito	0	0	0	4	6	13	21
Metabolito	0	0	0	0	0	0	0
Metabolito	0	0	2	5	11	13	22
Metabolito	0	0	0	6	8	5	9
Metabolito	0	0	0	3	7	15	22
Metabolito	0	0	0	4	8	16	22
Metabolito	0	0	2	4	8	15	21
Metabolito	0	0	1	5	9	17	24
Metabolito	0	0	0	3	6	16	23
Metabolito	0	0	2	4	11	16	20
E-10	0	0	1	5	10	13	22
E-10	0	0	1	10	16	15	22
E-10	0	0	3	12	18	20	28
E-10	0	0	1	9	12	18	26
E-10	0	0	0	0	2	9	12
E-10	0	0	1	6	13	16	24
E-10	0	0	1	5	9	16	22
E-10	0	0	0	0	0	1	3
E-10	0	0	2	5	9	7	22
E-10	0	0	3	6	14	15	24
E-10	0	0	1	6	10	12	20
E-10	0	0	0	1	3	8	10
E-10	0	0	0	1	3	5	8
E-10	0	0	2	7	14	22	30
E-10	0	0	2	8	14	23	31
E-10	0	0	0	4	8	15	21
E-10	0	0	2	7	13	22	29
E-10	0	0	0	0	0	0	0
E-10	0	0	2	5	11	17	28
E-10	0	0	2	0	2	6	10
E-10	0	0	4	10	18	15	22
E-10	0	0	2	3	8	14	23
E-10	0	0	3	8	14	17	29
E-10	0	0	0	2	5	9	14
E-10	0	0	0	2	7	10	16
E-10	0	0	1	7	12	23	31
E-10	0	0	2	9	15	17	28
E-10	0	0	2	9	14	24	31
E-10	0	0	2	10	15	25	30
E-10	0	0	2	11	17	21	30
Control -	0	0	1	7	12	18	24
Control -	0	0	2	10	15	21	31

Control -	0	0	3	10	14	18	30
Control -	0	0	3	11	17	22	38
Control -	0	0	3	0	0	0	0
Control -	0	0	0	1	4	7	13
Control -	0	0	0	7	13	10	24
Control -	0	0	2	5	11	12	26
Control -	0	0	2	5	11	19	28
Control -	0	0	2	4	12	15	31
Control -	0	0	0	0	3	4	7
Control -	0	0	0	0	0	0	0
Control -	0	0	0	0	3	10	13
Control -	0	0	3	3	4	3	5
Control -	0	0	0	0	0	0	0
Control -	0	0	4	10	15	27	35
Control -	0	0	4	10	16	28	33
Control -	0	0	2	5	10	23	28
Control -	0	0	0	6	11	25	31
Control -	0	0	0	1	5	26	32
Control -	0	0	2	10	13	17	22
Control -	0	0	0	0	0	0	0
Control -	0	0	1	2	5	7	10
Control -	0	0	2	10	14	12	16
Control -	0	0	0	0	1	7	9
Control -	0	0	4	13	18	24	32
Control -	0	0	1	5	7	18	24
Control -	0	0	0	0	1	7	11
Control -	0	0	3	11	17	16	22
Control -	0	0	0	12	17	20	28

Anexo 10: Tabla de medidas de evaluación de cada repetición de tratamiento en el área de foliar de la planta de frijol a nivel invernadero.

Tratamiento	Altura	#H G	#H M	#H P	botones de hojas	Peso fresco	Peso Seco	Botones florales	#hojas
Fta	11	0	6	3	4	3.94	0.24	0	9
Fta	16	4	2	6	5	8.32	1.12	0	12
Fta	15.8	5	6	6	3	10.2	1.05	0	17
Fta	15.5	0	9	3	5	6.49	0.68	0	12
Fta	16.2	5	6	3	4	10.26	0.79	0	14
Fta	13	2	9	0	3	8.23	0.5	0	11
Fta +P	13.5	3	3	3	1	3.91	0.86	0	9
Fta +P	15.7	4	9	3	3	10.39	1.05	0	16
Fta +P	15.7	0	0	6	1	2.48	0.67	0	6
Fta +P	14.6	3	6	3	3	10.09	1.14	0	12
Fta +P	12.6	0	4	3	1	2.41	0.77	0	7
Fta +P	14.5	0	4	3	1	3.57	0.91	0	7
Fta +P	13.9	0	4	2	1	3.25	0.71	0	6
Fta +P	14	0	6	3	3	5.31	0.71	0	9
F4C	16.3	0	6	6	4	6.44	0.78	0	12
F4C	16	5	6	4	3	10.51	0.69	0	15
F4C	15	2	9	3	4	10.37	0.71	0	14
F4C	16.6	2	9	3	3	8.9	0.99	0	14
F4C	16.9	1	9	6	5	9.76	1.24	0	16
F4C	16	1	9	3	5	8.64	0.84	0	13
F4C +P	9	0	3	3	1	3.65	0.79	0	6
F4C +P	17	0	4	3	2	3.11	0.85	0	7
F4C +P	16.1	0	4	3	1	2.95	0.74	0	7
F4C +P	17	0	1	3	2	1.93	0.53	0	4
F4C +P	15	1	8	5	4	6.43	1.13	0	14
F4C +P	16.4	0	0	5	2	3.27	0.81	0	5
F4C +P	16.2	0	4	3	1	2.49	0.79	0	7
F4C +P	16.2	0	5	3	1	4.96	1.09	0	8
F-20C	17.7	0	9	3	4	7.43	0.91	0	12
F-20C	16.5	2	9	0	5	7.87	0.85	0	11
F-20C	17.5	1	9	6	3	10.51	1.19	0	16
F-20C	17.8	1	9	6	4	10.42	1.23	0	16
F-20C	16	1	6	6	3	6.24	0.76	0	13
F-20C	18	1	9	3	5	9.72	1.14	0	13
F-20C +P	18.5	0	5	3	2	4.4	1.16	0	8
F-20C +P	17.4	0	4	2	1	3	0.99	0	6
F-20C +P	17.2	0	3	3	3	2.49	0.62	0	6

F-20C +P	18.8	2	8	5	4	10.2	1.07	0	15
F-20C +P	17.5	1	9	3	4	8.74	1.09	0	13
F-20C +P	19	2	8	5	3	9.94	1.27	0	15
F-20C +P	13.6	0	2	3	2	2.17	0.7	0	5
F-20C +P	14	2	6	6	4	12.81	1.37	0	14
F lio	17.7	0	7	3	3	11.55	1.51	0	10
F lio	16.3	0	10	3	2	8.36	0.94	0	13
F lio	14.5	2	9	6	4	8.58	0.91	0	17
F lio	18	2	10	3	3	11.9	1.53	2	15
F lio	18.3	1	9	6	4	8.1	1.03	0	16
F lio	16.2	2	9	3	3	8.51	0.79	0	14
F lio +P	16.5	2	9	6	4	11.6	1.41	0	17
F lio +P	15.6	0	9	5	2	4.98	0.87	0	14
F lio +P	13.7	0	4	3	1	2.93	0.79	2	7
F lio +P	15.6	0	6	6	2	5.03	0.71	0	12
F lio +P	14	0	5	3	2	3.86	0.96	2	8
F lio +P	15	0	5	3	1	2.92	0.82	0	8
F lio +P	15	3	8	6	3	10.5	0.97	0	17
F lio +P	17.2	3	1	9	3	7.1	0.92	0	13
S ta	14.4	2	6	3	2	7.12	0.77	0	11
S ta	14.5	0	8	3	2	5.25	0.69	0	11
S ta	17	2	6	5	3	8.23	0.99	0	13
S ta	15	0	6	3	2	3.4	0.39	0	9
S ta	16.2	2	9	6	3	10.46	0.79	0	17
S ta	15	1	8	3	3	8.34	1	0	12
S ta +P	9	0	2	5	0	2.46	0.94	0	7
S ta +P	13	0	5	6	4	4.46	0.47	0	11
S ta +P	16.3	0	3	9	3	4.85	0.61	0	12
S ta +P	9	0	3	3	1	3.51	1.27	0	6
S ta +P	16	0	5	3	2	3.39	0.74	0	8
S ta +P	13.4	0	2	3	1	2.2	0.33	0	5
S ta +P	9	0	3	2	0	3.8	0.6	0	5
S ta +P	15.8	0	3	3	1	3.23	0.62	0	6
S 4C	15.4	2	9	3	2	7.82	0.88	0	14
S 4C	17	0	10	6	3	9.67	1.22	0	16
S 4C	15	1	9	0	3	7.85	0.84	0	10
S 4C	16.1	2	9	3	3	9.61	1.1	0	14
S 4C	14.3	0	9	0	3	5.52	0.81	0	9
S 4C	16.4	1	12	6	2	9.74	1.29	0	19
S 4C +P	16	0	7	6	2	6.91	1.01	0	13
S 4C +P	16.5	0	7	6	1	7.37	0.96	0	13
S 4C +P	12	0	4	2	0	2.49	1.04	0	6

S 4C +P	6	0	2	3	0	1.69	0.46	0	5
S 4C +P	13.5	0	4	6	1	4.96	0.9	0	10
S 4C +P	13.5	0	5	0	1	2.39	0.45	0	5
S 4C +P	16.6	2	6	6	1	9.79	1.05	0	14
S 4C +P	15	2	9	3	2	11.57	1.28	0	14
S -20C	17.3	3	6	6	1	9.34	1.26	0	15
S -20C	17	2	9	3	2	10.32	1.15	0	14
S -20C	15	0	10	3	2	6.83	0.99	0	13
S -20C	18	4	9	3	2	10.25	1.21	2	16
S -20C	16.7	1	6	3	2	7.5	0.93	0	10
S -20C	15.4	1	9	4	3	8.95	0.87	0	14
S -20C +P	14.6	0	11	3	3	7.18	0.91	0	14
S -20C +P	15	0	4	2	2	3.72	0.75	2	6
S -20C +P	5	0	3	3	0	18.5	0.67	2	6
S -20C +P	15.1	4	9	6	2	8.75	1.18	0	19
S -20C +P	14.5	0	6	6	2	5.81	1.19	0	12
S -20C +P	10	0	3	3	0	4.05	0.92	0	6
S -20C +P	16.3	0	3	3	1	3.56	0.71	0	6
S -20C +P	19	0	4	3	1	4.23	0.9	0	7
S lio	16	0	8	3	2	5.51	1.01	0	11
S lio	16.8	0	8	6	2	6.86	0.84	0	14
S lio	18.5	5	6	6	3	10.21	1.51	0	17
S lio	16.8	0	9	6	3	7.03	0.86	2	15
S lio	18.5	4	8	3	3	8.35	1.62	0	15
S lio	16.3	2	9	3	3	8.49	1.07	0	14
S lio +P	5	0	3	2	0	1.59	0.65	1	5
S lio +P	15	0	3	3	1	3.03	0.78	1	6
S lio +P	12	0	3	3	0	2.43	0.59	0	6
S lio +P	10	0	2	3	1	3.01	0.82	0	5
S lio +P	11	1	4	6	2	6.82	1.02	0	11
S lio +P	14	1	5	3	1	3.76	0.78	0	9
S lio +P	15	0	11	3	5	7.62	1.05	2	14
S lio +P	15	0	4	2	0	2.3	0.69	0	6
E-10	14	0	9	4	3	6.61	0.88	0	13
E-10	17	0	9	8	3	7.75	0.97	0	17
E-10	17	0	9	7	4	11.43	1.4	0	16
E-10	16.8	0	11	3	3	9.33	0.97	1	14
E-10	15.7	4	7	6	3	9.73	1.23	2	17
E-10	16	2	9	3	3	9.26	1.09	0	14
E-10	16	4	5	7	3	8.8	1.02	0	16
E-10	16.7	3	7	4	3	10.65	1.41	0	14
E-10	12.3	4	5	6	4	12.39	1.31	0	15

E-10	14.7	5	6	3	3	9.88	1	0	14
H2O	16	0	7	5	2	8.09	0.95	0	12
H2O	15	2	8	3	2	9.83	1.14	0	13
H2O	15	0	7	3	3	6.14	0.72	0	10
H2O	16	2	6	3	3	9.2	1.03	0	11
H2O	15	3	6	6	6	8.01	1.22	0	15
H2O	15.3	3	7	3	3	7.97	1.03	0	13
H2O	15	2	6	2	2	7.42	0.64	0	10
H2O	15.2	1	6	3	3	9.48	1.24	0	10
H2O	14	1	7	3	3	9.22	1	0	11
H2O	14.3	2	4	6	6	9.92	1.41	0	12
PA	12	0	0	3	2	2.24	0.41	0	3
PA	13	2	4	6	2	9.08	1.21	0	12
PA	14	0	3	3	1	2.63	0.6	0	6
PA	14	0	0	3	1	1.46	0.34	0	3
PA	7	0	0	4	1	1.31	0.42	0	4
PA	13	0	6	6	2	6.89	0.85	0	12
PA	15	0	3	12	2	5.88	0.71	0	15
PA	7	0	2	3	1	1.75	0.62	0	5
PA	14	1	9	3	2	8.78	0.97	0	13
PA	10	0	3	3	1	2.03	0.58	0	6
CQ	14	1	9	6	3	13.07	1.64	0	16
CQ	12	0	10	6	3	4.73	0.59	0	16
CQ	14	0	6	4	3	7.96	0.92	0	10
CQ	14	1	6	4	2	8.54	1.01	0	11
CQ	14.2	0	11	3	2	8.91	1.01	0	14
CQ	15	0	6	9	3	6.07	0.7	0	15
CQ	15.7	0	12	0	3	6.58	0.85	0	12
CQ	16	0	8	3	3	7.9	1.03	0	11
CQ	15.6	0	9	3	2	6.97	1.03	0	12
CQ	15.4	0	6	6	2	4.46	0.67	0	12

Anexo 11: Tabla de medidas de evaluación de cada repetición de tratamiento en el área Radicular de la planta de frijol a nivel invernadero.

TRATAMIENTO	Largo de Raíz (cm)	Raíz peso fresco(g)	Raíz peso seco (g)	Peso Nodulos (g)	Nodulos, peso seco(g)	insidencia
F t.a	15	7.09	0.64	1.71	0.7018	0
F t.a	13	2.7	0.36	0.01	0.0049	0
F t.a	10	5.36	0.31	0	0	0
F t.a	13	6.52	0.42	0	0	0
F t.a	13	9.59	0.81	0.06	0.0121	0
F t.a	16	9.58	0.83	0.01	0.0021	0
F t.a +P	7	3.94	0.49	0	0	7
F t.a +P	10	9.3	1	0.43	0.0757	7
F t.a +P	14	7.59	0.89	0.01	0.0027	7
F t.a +P	8	2.03	0.28	0.69	0.1124	9
F t.a +P	9	2.5	0.35	0	0	9
F t.a +P	8	2.18	0.34	0	0	9
F t.a +P	8.3	1.37	0.24	0	0	9
F t.a +P	7.6	1.2	0.16	0	0	9
F 4C	12	5.82	0.62	0.06	0.0104	0
F 4C	15	3.24	0.54	0	0	0
F 4C	16	10.79	0.95	0.01	0.0099	0
F 4C	12	10.46	0.82	0.27	0.0605	0
F 4C	16	6.49	0.59	0.01	0.0055	0
F 4C	14	8.6	0.92	2.03	0.7826	0
F 4C +P	9.6	3.91	0.4	0	0	9
F 4C +P	9	3.96	0.45	0	0	9
F 4C +P	11	3.79	0.62	0	0	9
F 4C +P	8	2.59	0.4	0	0	9
F 4C +P	13	3.37	0.3	0	0	9
F 4C +P	8	3.24	0.19	0	0	9
F 4C +P	12	4.89	0.23	0	0	9
F 4C +P	10	3.62	0.19	0	0	9
F -20C	17	10.54	1.17	0.01	0.0207	0
F -20C	17	11.38	1.24	0.15	0.0271	0
F -20C	15	4.17	0.35	0.47	0.1098	0
F -20C	15	5.73	0.89	0.37	0.1077	0
F -20C	18	11.91	1.02	0.14	0.048	0
F -20C	15	12	1.02	0.14	0.1028	0
F -20C +P	10	4.48	0.27	0	0	9
F -20C +P	11	4.52	0.47	0	0	9
F -20C +P	14	10.3	1.79	0.04	0.0117	5

F -20C +P	14	7.29	0.63	0.26	0.0424	7
F -20C +P	12.5	6.37	0.3	0	0	7
F -20C +P	13.6	6.41	0.34	0	0	7
F -20C +P	14	8.35	0.72	0	0	7
F -20C +P	12	8.55	0.7	0	0	7
F lio	15	8.3	0.72	0.01	0.0169	0
F lio	17	5.77	1.49	0.26	0.0872	0
F lio	17	5.93	0.52	0.28	0.3855	0
F lio	16	6.6	0.76	1.27	0.1101	0
F lio	15	7.37	1.44	0.27	0.0975	0
F lio	16	8.31	0.72	0	0	0
F lio +P	23	10.67	1.32	0	0	7
F lio +P	15	10.4	0.5	0	0	7
F lio +P	13	9.17	0.78	0	0	7
F lio +P	11	8.49	0.61	0	0	7
F lio +P	10	5.48	0.53	0	0	9
F lio +P	12	6.13	0.64	0	0	7
F lio +P	12	7.87	0.7	0	0	7
F lio +P	13	7.98	0.87	0	0	7
S t.a	13	11.49	1.09	0.25	0.0052	0
S t.a	10	9.4	0.68	0	0	0
S t.a	15	7.78	0.75	0.13	0.0056	0
S t.a	17	10.19	0.57	0.06	0.0108	0
S t.a	11	6.22	0.38	0	0	0
S t.a	11	6.48	0.87	0.14	0.031	0
S t.a +P	12	4.51	0.63	0	0	7
S t.a +P	11	6.84	0.51	0.16	0.0135	7
S t.a +P	11	8.51	1.02	0.22	0.279	7
S t.a +P	11	4.42	0.28	0	0	9
S t.a +P	9	2.92	0.36	0	0	9
S t.a +P	7	3.25	0.34	0	0	9
S t.a +P	6	1.09	0.21	0	0	9
S t.a +P	5	1.26	0.16	0	0	9
S 4C	16	9.83	0.73	0.01	0.0129	0
S 4C	13	9.9	0.86	0.01	0.0135	0
S 4C	12	7.63	0.38	0	0	0
S 4C	13	7.99	1.4	0.01	0.0239	0
S 4C	16.3	7.89	1.02	0.1	0.0476	0
S 4C	15.4	13.1	1.66	1.48	0.5098	0
S 4C +P	15.3	12.18	0.74	0.3	0.5172	9
S 4C +P	14	14.2	1.26	0.33	0.0106	9
S 4C +P	10.7	4.67	0.98	0	0	9

S 4C +P	10	3.63	0.23	0	0	9
S 4C +P	9	2.34	0.44	0	0	9
S 4C +P	9	2.31	0.16	0	0	7
S 4C +P	21	11.09	0.82	0.62	0.0485	7
S 4C +P	13.5	7.5	0.69	0.03	0.0058	9
S -20C	17	7.35	1.6	0.45	0.1061	0
S -20C	16.8	7.32	1.87	0.04	0.0098	0
S -20C	19	11.3	1.86	0.8	0.1974	0
S -20C	16	8.24	1.63	0.07	0.1098	0
S -20C	21	12.2	0.94	0.27	0.0275	0
S -20C	15	9.84	0.9	0.04	0.003	0
S -20C +P	15	9.44	0.97	0.15	0.012	7
S -20C +P	13	6.33	0.47	0.1	0.0186	7
S -20C +P	10	4.89	0.49	0	0	9
S -20C +P	12	6.7	0.89	0.18	0.0153	7
S -20C +P	15	3.66	0.41	0	0	9
S -20C +P	9	3.44	0.19	0	0	9
S -20C +P	12	5.28	0.66	0	0	9
S -20C +P	14	5.84	0.63	0	0	9
S lio	16.4	9.4	0.54	0	0	0
S lio	16	9.71	0.76	0	0	0
S lio	18	10.5	0.39	0.54	0.1312	0
S lio	14	7.14	0.68	0.06	0.0192	0
S lio	18	5.88	0.58	0.13	0.0157	0
S lio	17	12.7	1.05	0.2	0.0181	0
S lio +P	13	6.58	1.66	0	0	7
S lio +P	13.3	7.18	1.7	0	0	7
S lio +P	12	5.87	1.08	0	0	7
S lio +P	15	7.46	1.23	0	0	7
S lio +P	13	3.98	0.38	0	0	7
S lio +P	3.5	3.72	0.33	0	0	7
S lio +P	12	8.72	1.21	0	0	5
S lio +P	13	8.68	1.12	0	0	5
E-10	20	1.17	0.33	0.54	0.0855	0
E-10	20	1.4	0.43	0.62	0.1202	0
E-10	18	7.9	0.68	1.24	0.4495	0
E-10	13	5.18	0.48	1.38	0.524	0
E-10	18	8.54	0.76	0.78	0.233	0
E-10	10	6.33	0.52	1.54	0.6146	0
E-10	14	9.57	0.97	1.66	0.1783	0
E-10	15	5.19	0.39	0.71	0.0822	0
E-10	25	5.72	0.39	1.08	0.1406	0

E-10	21	6.88	0.93	1.88	0.4717	0
CQ	27	4.8	0.54	2.38	0.3357	0
CQ	7	6.49	0.44	0.06	0.0061	0
CQ	18	6.57	0.47	0.15	0.0221	0
CQ	24	10.68	0.81	0.19	0.0155	0
CQ	15	8.08	0.8	0.58	0.0693	0
CQ	14.8	7.33	0.53	0.48	0.0465	0
CQ	16	7.7	0.48	0.23	0.0324	0
CQ	13	11.18	0.96	0.2	0.0272	0
CQ	18	2.08	0.3	0	0	0
CQ	12	0.91	0.24	0	0	0
PA	90	6.98	0.48			7
PA	13	8.43	0.41	0.2	0.0208	5
PA	7	2.45	0.26			9
PA	6	2.39	0.2			9
PA	6	3.62	0.33			9
PA	10	6.55	0.58	0.13	0.0115	7
PA	7	2.84	0.24			9
PA	7	3.98	0.49			9
PA	12	4.24	0.38			9
PA	8.6	3.21	0.39	0.08	0.0065	9
H2O	11	6.94	0.42	0.82	0.0828	0
H2O	19	7.09	0.53	0.24	0.0255	0
H2O	20	8.39	0.48	0.08	0.006	0
H2O	23	8.13	0.71	0	0	0
H2O	12	7	0.42	0.4	0.0377	0
H2O	23	7.93	0.58	0.43	0.0458	0
H2O	16	8.46	0.57	0	0	0
H2O	13	8.07	0.53	0.19	0.0139	0
H2O	16	7.96	0.52	0.08	0.0066	0
H2O	11.5	13.18	0.84	0.23	0.035	0